

(19)【発行国】日本国特許庁（ＪＰ）

(12)【公報種別】公表特許公報（Ａ）

(11)【公表番号】特表２００３－５０３７３２（Ｐ２００３－５０３７３２Ａ）

(43)【公表日】平成１５年１月２８日（２００３．１．２８）

(54)【発明の名称】センサープラットフォーム、そのプラットフォームを組み込んだ器具、およびそのプラットフォームを使用する方法

(51)【国際特許分類第７版】

G01N 21/64
21/78

【ＦＩ】

G01N 21/64 G
21/78 C

【審査請求】未請求

【予備審査請求】有

【全頁数】８４

(21)【出願番号】特願２００１－５０８０３６（Ｐ２００１－５０８０３６）

(86)(22)【出願日】平成１２年７月３日（２０００．７．３）

(85)【翻訳文提出日】平成１３年１２月２８日（２００１．１２．２８）

(86)【国際出願番号】ＰＣＴ／ＥＰ００／０６２３８

(87)【国際公開番号】ＷＯ０１／００２８３９

(87)【国際公開日】平成１３年１月１１日（２００１．１．１１）

(31)【優先権主張番号】９９１５７０３．４

(32)【優先日】平成１１年７月５日（１９９９．７．５）

(33)【優先権主張国】イギリス（ＧＢ）

(31)【優先権主張番号】００１１４２０．７

(32)【優先日】平成１２年５月１１日（２０００．５．１１）

(33)【優先権主張国】イギリス（ＧＢ）

(81)【指定国】ＥＰ（ＡＴ，ＢＥ，ＣＨ，ＣＹ，ＤＥ，ＤＫ，ＥＳ，ＦＩ，ＦＲ，ＧＢ，ＧＲ，ＩＥ，Ｉ

T, LU, MC, NL, PT, SE) , OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) , AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW) , EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) , AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71)【出願人】

【氏名又は名称】 ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト

【住所又は居所】 スイス国、４０５６ バーゼル、リヒトシュトラッセ ３５

(72)【発明者】

【氏名】 ボルフガング・エルンスト・グスタフ・ブダッハ

【住所又は居所】 ドイツ連邦共和国デー７９４１８シュリーエンゲン・マウヒェン、アウゲナー・シュトラッセ ３番

(72)【発明者】

【氏名】 ディーター・ノイシェーファー

【住所又は居所】 スイス、ツェーハー ４１３２ ムッテンツ、パッペルベーク ６番

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆 (外３名)

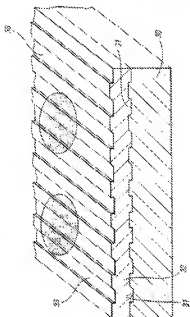
【テーマコード (参考)】

2G043
2G054

【Ｆターム (参考)】

2G043 AA01 AA04 BA16 CA04 DA02 DA05 EA01 GA07 GA09 GB01 GB03 GB07 GB16 GB21 KA03 KA09 LA01
2G054 AA06 CA22 CA23 EA03 FA13 FA21 FA27 GA04 GA05

試料分析で使用するためのセンサーブラットホームは、屈折率(n_1)の基板(30)およびその基板上に屈折率(n_2)の薄い、光透過性の層(32)を備えていて、(n_2)は(n_1)より大きい。このブラットホームは、それぞれの一つもしくはそれ以上の捕獲要素に対して一つもしくはそれ以上の検知区域を規定するところの周期性の溝(31)、(33)の形式で、一重もしくは多重の波形構造を組み込んでいる。これらの溝は、コヒーレント光がブラットホーム上に入射するとき、この光は個別のビームもしくは回折オーダーに回折して、透過ビームの減少および入射光の異常に高い反射をもたらし、それにより、それもしくはそれぞれの検知区域の表面で増強したエバネッセント場を創成するように、形状化し、寸法化しかつ配向している。共振条件でのこの場の振幅は、先行技術のブラットホームの場合よりもおよそ100のオーダーでより大きいので、試料からブラットホーム上に創成されるルミネッセンスの強度がまた100の係数で増加する。また開示されているのは、このブラットホームを組み込んでいる器具およびこのブラットホームを使用する方法である。



請求の範囲

【特許請求の範囲】

【請求項1】 屈折率(n_1)を有する光透過性の基板、その基板の一つの表面上に形成した薄い、光透過性の層を備えている試料分析で使用するためのブラットホームであって、当該層は(n_1)より大きい屈折率(n_2)を有し、当該ブラットホームはその中に、それぞれの一重もしくは多重の捕獲要素に対して、一重

もしくは多重の検知区域または領域を規定する周期性の溝を備えた一重もしくは多重の波形構造を組み込んでいて、当該溝はa)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレント光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折するが、それらは干渉して透過ビームの減少および入射光の異常に高い反射をもたらす、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するか；またはb)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレントな直線偏光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折するが、それらは干渉して透過ビームの殆んど全部の消滅および入射光の異常に高い反射をもたらす、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するかのどちらかのように、形状化し、寸法化しかつ配向している、ブラットホーム。

【請求項2】 屈折率(n_1)を有する光透過性の基板、その基板の一つの表面上に形成した薄い、光透過性の層を備えているブラットホームであって、当該層は(n_1)より大きい屈折率(n_2)を有し、当該ブラットホームはその光透過性の層の中に、実質的に全体のブラットホームにわたって一重の波形構造もしくはブラットホーム上に配置した別の多重の波形構造を組み込んでいて、当該構造は実質的に平行な周期性の溝を備えているが、それらはモノもしくは多回折性であって、溝は一重もしくは多重の検知区域または領域を表わし、そこにおいては(a)この溝の深さは3 nmから光透過性の層の厚さまでの範囲にあり、(b)この光透過性の層の厚さは30から1000 nmまでの範囲にあり、(c)この波形構造の周期は200から1000 nmまでの範囲にあり、(d)この光透過性の層の厚さに対する溝の深さの比率は0.02から1までの範囲にあり、そして(e)溝の周期に対する溝の幅の比率は0.2から0.8までの範囲にある、ブラットホーム。

【請求項3】 請求項2で請求したブラットホームであって、その配列は使用において溝が、a)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレント光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折するが、それらは干渉して透過ビームの減少および入射光の異常に高い反射をもたらす、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するか；またはb)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレントな直線偏光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折するが、それらは干渉して透過ビームの殆んど全部の消滅および入射光の異常に高い反射をもたらす、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生する、のどちらかのように、形状化し、寸法化しかつ配向している、ブラットホーム。

【請求項4】 ブラットホームの基板を無機物質から形成する、請求項1～3のいずれか1項記載のブラットホーム。

【請求項5】 その基板を有機物質から形成する、請求項1～3のいずれか1項記載のブラットホーム。

【請求項6】その基板をガラス、 SiO_2 、水晶もしくは Si から形成する、請求項4記載のブラットホーム。

【請求項7】その基板をPP、PC、PMMA、PI、PS、PE、PETもしくはPUのような有機ポリマーから形成する、請求項5記載のブラットホーム。

【請求項8】光透過性の層を無機物質から形成する、請求項1～3のいずれか1項記載のブラットホーム。

【請求項9】光透過性の層を有機物質から形成する、請求項1～3のいずれか1項記載のブラットホーム。

【請求項10】光透過性の層が Ta_2O_5 、 TiO_2 、 Nb_2O_5 、 ZrO_2 、 ZnO もしくは HfO_2 のような金属酸化物である、請求項8記載のブラットホーム。

【請求項11】光透過性の層をポリアミド、ポリイミド、PP、PS、PMMA、ポリアクリル酸、ポリアクリルエーテル、ポリチオエーテルもしくはポリ(フェニレンスルフィド)およびそれらの誘導体から形成する、請求項9記載のブラットホーム。

【請求項12】回折溝の深さが3nmから光透過性の層の厚さまで、好ましくは10nmから光透過性の層の厚さまでの範囲にある、請求項1もしくは請求項1に従属するときは請求項4～11のいずれか1項記載のブラットホーム。

【請求項13】光透過性の層の厚さは30から1000nmまでの範囲にあり、回折溝の周期は200から1000nmまでの範囲にあり、この光透過性の層の厚さに対するこの溝の深さの比率は0.02から1までの範囲にあり、そして溝の周期に対する溝の幅の比率は0.2から0.8までの範囲にあつて、極めて短い伝播距離をもたらす、請求項12記載のブラットホーム。

【請求項14】この溝が一般的に断面において長方形である、前の請求項のいずれかに記載のブラットホーム。

【請求項15】この溝が一般的に断面において正弦曲線状、台形波状、鋸歯断面状である、請求項1～13のいずれか1項記載のブラットホーム。

【請求項16】ブラットホームは正方形もしくは長方形であり、そして溝はブラットホームに沿って直線的に伸展する、前の請求項のいずれかに記載のブラットホーム。

【請求項17】ブラットホームは円盤状であり、そして溝は円形もしくは線形である、請求項1～15のいずれか1項記載のブラットホーム。

【請求項18】溝を基板の表面上に形成する、前の請求項のいずれかに記載のブラットホーム。

【請求項 1 9】 溝を光透過性の層の表面上に形成する、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項記載のブラットホーム。

【請求項 2 0】 溝を基板の表面上および光透過性の層の表面上の両方に形成する、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項記載のブラットホーム。

【請求項 2 1】 一つもしくはそれ以上の検知区域の波形表面を、ある特定の励起波長および／もしくは特定のタイプの偏光に対し最適化する、前の請求項のいずれかに記載のブラットホーム。

【請求項 2 2】 一つもしくはそれ以上の検知区域の波形表面を、異なる波長および／もしくは偏光の配向に対し最適化する、請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項記載のブラットホーム。

【請求項 2 3】 光透過性の層の表面が一つもしくは複数の検知区域を含み、それもしくはそれらのおおのが一つもしくは複数の捕獲要素を担う、前の請求項のいずれかに記載のブラットホーム。

【請求項 2 4】 おおのの捕獲要素は、親和性反応ができるところの個別のおよび／もしくは混合の捕獲分子を含む、請求項 2 3 記載のブラットホーム。

【請求項 2 5】 捕獲要素を二次元アレーで配列する、請求項 2 3 記載のブラットホーム。

【請求項 2 6】 捕獲分子の固定化を可能にするために、光透過性の層の表面に固着した接着促進層を含む、請求項 2 3 から請求項 2 5 のいずれか 1 項記載のブラットホーム。

【請求項 2 7】 接着促進層は無機および／もしくは有機分子またはそれらの誘導体の一重および多重の層を含み、それらは、得られた接着促進層システムの全体的な機能的性質を操作するために、付加的な化学的、物理的、分光学のおよび／もしくは光物理的、光化学的／生物学的／生化学的性質を付与する、請求項 2 6 記載のブラットホーム。

【請求項 2 8】 ブラットホームを複数の検知区域もしくは領域とともに形成し、おおのは試料の多色の励起および検出に適するそれ自身の回折溝もしくは多重の積層溝を有する、前の請求項のいずれかに記載のブラットホーム。

【請求項 2 9】 ブラットホーム上に固定化すべき捕獲要素もしくは分子の数は限定されことなく、遺伝子、DNA 配列、DNA モチーフ、DNA マイクロサテライト、単一ヌクレオチド多型、興味ある種もしくは生体のゲノムに寄与するタンパク質もしくは細胞断片、またはそれらの選択もしくは組み合わせの数に対応する、請求項 1 ～ 2 3 のいずれかに記載のブラットホーム。

【請求項 3 0】 一つもしくは複数の捕獲要素または分子が次の一つもしくはそれ以上を含む、請求項 2 3 ～ 2 9 のいずれか 1 項記載のブラットホーム：ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド(およびそれらの化

学的誘導体) DNA(二本鎖もしくは一本鎖) a)直線型(およびそれらの化学的誘導体)、b)環状型(例えば、プラスミド、コスミド、BAC、YAC)全RNA、メッセンジャーRNA、cRNA、ミトコンドリアRNA、人工RNA、アプタマーPNA(ペプチド核酸)ポリクローナル、モノクローナル、組み替え型の、改変した抗体、抗原、ハプテン、抗体FABサブユニット(必要により修飾した)タンパク質、修飾したタンパク質、酵素、酵素コファクターもしくは阻害剤、タンパク質複合体、レクチン、ヒスチジン標識タンパク質、ヒスチジンタグ成分(H i s - t a g)のためのキレーター、タグ付けタンパク質、人工抗体、分子インプリント、プラスチックボディ膜受容体、全細胞、細胞断片および細胞性下部構造、シナプス、アゴニスト/アンタゴニスト、細胞、細胞内小器官、例えばミクロソーム ベンゾジアゼピンのような小分子 プロスタグランジン 抗生物質、薬剤、代謝物、薬剤代謝物 天然物 炭水化物および誘導体 天然および人工リガンドステロイド、ホルモンペプチド 生来もしくは人工ポリマー 分子プローブ 天然および人工受容体 そしてそれらの化学的誘導体 キレート試薬、クラウンエーテル、リガンド、超分子集合体 指示薬(pH、電位、膜電位、酸化還元電位) 組織試料(組織マイクロアレイ)。

【請求項31】 前の請求項のいずれか記載のプラットフォームを備える、検体を分析するための器具、ここでは光ビームを発生させて、それがエバネッセント共鳴をプラットフォームで起こさせ、それによってプラットフォームの検知区域中に増強した共鳴場を創成させるところの角度でプラットフォーム上に入射させるように、ビームを指示する手段、ならびにプラットフォームの検知区域上にもしくは近傍に固着する物質の特質を検出するための手段。

【請求項32】 光発生の手段が、コヒーレントレーザービームを放射するためのレーザーを備える、請求項31記載の器具。

【請求項33】 光発生の手段が、放電ランプまたはHgもしくはXeランプのような低圧ランプ、または光放射ダイオードを含む、請求項31記載の器具。

【請求項34】 請求項32記載の器具であって、それが角度 θ でプラットフォームに入射するようにレーザービームを指示するための光学エレメントを含み、その角度 θ は式 $\sin \theta = n - \lambda / \Lambda$ によって定義され、そこでは Λ は回折溝の周期であり、 λ は入射光の波長であり、そして n は光透過性の層の有効屈折率である、器具。

【請求項35】 検出手段をアレンジして、蛍光、燐光、化学ルミネセンスおよび電子ルミネセンスのようナルミネセンスを検出する、請求項31～34のいずれか1項記載の器具。

【請求項36】 検出手段をアレンジして、屈折率における付加的もしくは合同の変化を検出する、請求項31～35のいずれか1項記載の器具。

【請求項37】入射ビームを配置して、全てもしくはおのおのの検知区域を照射する、請求項31～36のいずれか1項記載の器具。

【請求項38】分析すべき検知区域の小さな副部位を照射するようにビームを配置し、そしてブラットホームの検知区域にわたって走査するために相対的移動を実行できるように、ビームおよびブラットホームを配置する、請求項31～36のいずれか1項記載の器具。

【請求項39】試料を検知区域と接触させるために、ブラットホームの検知区域とは反対に位置させるカートリッジを含む、請求項31～38のいずれか1項記載の器具。

【請求項40】検査すべき複数の試料を含むためのマイクロタイタータイプの装置を含む、請求項31～38のいずれか1項記載の器具。

【請求項41】検体を請求項1～30のいずれか1項記載のブラットホームの検知区域と接触させること、エバネッセント共鳴をブラットホームの検知区域内で起こさせるように光ビームでそのブラットホームを照射することおよびその検知区域から発散する放射線を検出することを含む、一つもしくは複数の検体を分析する方法。

【請求項42】検査下の試料に蛍光を誘起する物質を加え、そして増強したエバネッセント場による試料の励起によって、当該試料に誘導された蛍光を検知することを含む、請求項41記載の方法。

【請求項43】蛍光を誘起する物質がルミネセンスのマーカーを含む、請求項41記載の方法。

【請求項44】ルミネセンスのマーカーは、400nmから1200nmまでの範囲にルミネセンスを有し、一つまたはそれ以上の親和性パートナーに付着するために官能基化もしくは修飾されている一つもしくは複数のルミネセンスの化合物を含み、以下の一つまたはそれ以上の誘導体を含む、請求項43記載の方法：ポリフェニルおよびヘテロ芳香族化合物、スチルベン、クマリン、キサンテン染料、メチン染料、オキサジン染料、ローダミン、フルオレセイン、クマリン、スチルベンパイレン、ペリレンシアニン、オキサシアニン、フタロシアニン、ポルフィリン、ナフタロシアニン、アゾベンゼン誘導体、ジスチルビルフェニル遷移金属錯体、例えばポリピリジル/ルテニウム錯体、塩化トリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム、塩化トリス(1,10-フェナンスロリン)ルテニウム、塩化トリス(4,7-ジフェニル-1,10-フェナンスロリン)ルテニウムおよびポリピリジル/フェナジン/ルテニウムの錯体、オクタエチル白金-ポルフィリン、ユーロピウムおよびテルビウム錯体、量子ドット粒子/ビーズもしくはそれらの誘導体。

【請求項45】以下のいずれか一つもしくはそれ以上において用いられるときの、請求項41～44のいずれか1項記載の方法：一遺伝子発現-ゲノム医学-薬理ゲノム医学-毒性ゲノム医学-毒性プロテ

オミックスー遺伝学ー薬理遺伝学ー毒性遺伝学ーエクソーム／イントロン発現プロファイリングーヒト白血球抗体(HLA)の判定ースプライシング変異体の分析ープロテオミックス(チップ上のタンパク質アッセイ)ー患者のモニタリング(薬物、代謝物およびマーカー)ーポイントオブケア、^①「個人別医療」ー診断学ープロテオミックス用のチップ上の二次ゲルーSNP(単一ヌクレオチド多形)、ミニシークエンシングー高スループットスクリーニングーコンビナトリアル化学ータンパク質ータンパク質相互作用ー分子相互作用ーチップを用いたタンパク質ー抗体およびペプチド相互作用ー緑色蛍光タンパク質(GFP)ーinsituハイブリダイゼーションー共焦点顕微鏡法ー蛍光相関分光法ー従来の顕微鏡法ーMALDIーTOFMS。

【請求項46】 検体分析用のプラットフォームであって、当該プラットフォームは一つもしくはそれ以上の検知区域を有し、それぞれは、プラットフォームをコヒーレント光で照射するときに相互作用して親和反応の指示を提供することができるものの一つもしくは複数の捕獲要素を受け取るためのものであり、そこではそれぞれの捕獲要素は二つまたはそれ以上の捕獲分子を含む、プラットフォーム。

詳細な説明

【発明の詳細な説明】

【0001】

この発明は試料分析の分野に一般的に関し、例えば、一般的にDNA、タンパク質および抗体のチップ技術として既知の親和性検知の分野において特定の、しかし独占的でない、応用性を有する。この発明の一つの態様は試料分析に使用し得るセンサープラットホームに関与する。この発明のもう一つの態様はセンサープラットホームを使用する器具に関与する。この発明のさらなる態様はそのプラットフォームを使用する試料分析の方法に関与する。

【0002】

二次元のアレーの試料を分析する技法は公知である。一つのそんな技法はELISAアッセイとして公知であり、抗体と抗原の間における強い生化学的反応に基づいている。特別なモノもしくはポリクローナル抗体を基板上に固定化して相補的な種と反応させる。発蛍光団で標識したマーカーを加え、酵素結合抗体を介して活性化し、そして蛍光を誘導するために、試料を光で照射する。蛍光を検知し、その蛍光の強度が親和性反応の指標となる。

【0003】

もう一つの既知の技法はW098/27430に記載されているものである。これには、多数の異なる種を基板上でアレーに固定化する。この種は写真平板手法によって基板上に固定化する。発蛍光団で標識したマーカーをこの種に加える。試料を作成し、固定化した種と反応させ、そして全体のチップを集束レーザービームで走査する。これに代えて、試料を作成し、発蛍光団で標識したマーカーで修飾し、固定化した種と反応させ、そして全部のチップを集束レーザービームで走査する。蛍光信号を光検出器で検出し、2Dパターンを作成する。個別の試料間におけるこのパターンの変化は遺伝子発現における相違の指標を提供し、それ故に薬理学および毒物学に関する情報を提供する。

【0004】

もう一つの既知の技法はエバネッセント波センサーに基づくものである。これらのセンサーではコヒーレントレーザー光を使用するが、この光が非常に薄い層にトラップされて、いわゆるエバネッセント電磁場を作り出して、それが実際の物理的センサーの外側に小さい距離で伸展する。この電磁場はセンサーの表面に付着した分子と相互作用することができる。このエバネッセント励起もしくは相互作用は、導波路の近辺に、典型的には可視光線では表面から0.5ミクロンの、非常に接近した領域に限定される。エバネッセント場は空間的に局在化したままであり、それらの蓄積したエネルギーを他の領域へ移動させない。レーザー光と分子とのこの相互作用は数多くの異なる方式で使用し得る。以下の例が挙げられる:1 エバネッセント場により誘導されたルミネセンスの検出。

2 試料の分子が捕獲分子と結合するとき起こる屈折率の変化の検出。

3 表面プラズモン共鳴の検出。

【0005】

エバネッセント場を用いる一つの特定のセンサーは平面導波路センサーとして公知である。この平面導波路センサーは、平面基板を備え、その上に薄い導波層を有している。この導波路層の一部は回折格子を組み込み、その上にレーザー光が入射されて、そこからレーザー光が発射されて、導波路層を通して回折格子より離れた検知領域に伝播するようにする。導波路センサーは、質量感受性モードで(上の例2および3を参照)もしくはルミネセンス励起と検出を組み合わせる超高感度(上の1を参照)でのどちらかで使用することができる。捕獲分子は検知区域上で固定化され、そしてそれから、同様な親和性(競合)を有する添加した標識分子の存在下でアナライト(試料)を検知区域/捕獲分子と接触させる。これに代えて、アナライト分子を固定化した捕獲分子と結合させてもよく、そしてさらに標識した種と捕獲アナライト分子との反応により蛍光標識を導入する。導波路層に発射されたレーザー光は発蛍光団のエバネッセント励起に至り、それがそれからアナライトの定量化を可能にする。発光した蛍光を検出し、そして

この蛍光強度が、アナライトおよび固定化した捕獲分子中に存在する親和性パートナー間で起こる相互作用の指標を提供する。注目すべきことは、このタイプの配置においては、レーザー放射線は導波路の中で比較的長い距離を伝播してカップリング回折格子と検知区域は幾何学的に離れていることである(WO 95/33197およびWO 95/33198を参照)。

【0006】

EP-0455067A2には、屈折率変化を検出する原理を利用する平面導波路センサーが記述されている。全体のブラットホームを覆って形成されたブラットホームの浅い溝が偏光したコヒーレント光を透明な導波路層中に連結し、そこでその光は幾らかの距離を経て解放される。この解放されたビームの角度は、アナライト分子が捕獲分子に結合するときに、変化する。

この屈折率タイプのもう一つの例はUS-A-5738825に示されている。ブラットホームは、マイクロタイプレートウェルと接触している個別の回折格子を含む。

【0007】

EP178083は表面プラズモン共鳴(SPR)を開示しているが、そこでは入射する光子のエネルギーは表面プラズモン波として電気エネルギーに転換される。このセンサーの構築では、本発明のブラットホームと対照的に、金属の層を必要とし、そして臨界角における反射光の量は、反射強度が殆んど100%に達する本発明と対照的に、ゼロであるかもしくはゼロに近い。

【0008】

上の技法の全てには種々の不利な点がある。幾らかの点は、それぞれの試料を個別に励起しなければならないので、非常に遅いことである。平面導波路のような他の点としては、一つ以上の試料を一度に励起はできるが、導波路の喪失および回折格子のカップリング効率の変化による結合したパワーの局所的な変化により、異なる捕獲要素間の蛍光の混信および局所的に変化する励起光の強度のために、全体的に信頼性のある結果を与えないことである。

【0009】

本発明は、多重の試料を同時に極めて高感度で、再現性の高い定量方式で分析することを可能にする技法に關与する。

【0010】

平面導波路センサーと対照的に、本発明はルミネセンスの混信を全く示さないで、局所的強度は良く規定されている。本発明は真の多重化を可能にする、即ち、変換器は積み重ね下部構造(平面導波路ではそうであるように)を全く必要としないで、万能のブラットホームとして見る事ができるが、そこで

は、要件次第で、認識要素のサイズおよび数は、チップ構造(波形区域および検知区域は、平面導波路ではそうであるように、分離されていない)における変更を必要としないで、技術的に可能な限定の中で変えることができる。加えて、この発明は、先行のエピ蛍光技法に比較して、約100倍強いルミネセンス強度を送り出す。実験的なセットアップは非常に簡単で、入射光ビームの角度の簡単な調整を単に必要とするだけである。本発明で記述される変換器は、従来の蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡およびレーザースキャナーに容易に適応させることができる。さらに、広域共鳴幅(最大の全半値幅、FWHM、として定義する)および正常入射におけるかそれに近い共鳴位置を持つ変換器にとって、角度の調整は時代遅れである。

【0011】

このブラットホームの製法は比較的簡単(安価)で、そして既存のシステム(例えば、蛍光スキャナー、顕微鏡、蛍光ミクロタイタープレートリーダー、等々)の性能は個々のセットアップを少し修飾することにより容易に増加し得る。

【0012】

本発明の最初の態様に従えば、屈折率(n_1)を有する光透過性の基板、その基板の一つの表面上に形成した薄い、光透過性の層を備えている試料分析用のブラットホームが提供されるが、当該層は(n_1)より大きい屈折率(n_2)を有し、当該ブラットホームはその中に、それぞれの一重もしくは多重の捕獲要素に対して、一重もしくは多重の検知区域または領域を規定する周期性の溝を備えた一重もしくは多重の波形構造を組み込んでいて、当該溝はa)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレント光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折するが、それらは干渉して透過ビームの減少および入射光の異常に高い反射をもたらす、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するか；またはb)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレントな直線偏光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折するが、それらは干渉して透過ビームの殆んど全部の消滅および入射光の異常に高い反射をもたらす、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するかのどちらかのように、形状化し、寸法化しかつ配向している。

【0013】

本発明の第二の態様に従えば、屈折率(n_1)を有する光透過性の基板、その基板の一つの表面上に形成した薄い、光透過性の層を備えているブラットホームが提供されるが、当該層は(n_1)より大きい屈折率(n_2)を有し、当該ブラットホームはその光透過性の層の中に、実質的に全体のブラットホームに覆って

一重の波形構造もしくはブラットホーム上に配置した別の多重の波形構造を組み込んでいて、当該構造は実質的に平行な周期性の溝を備えているが、それらはモノもしくは多回折性であって、溝は一重もしくは多重の検知区域または領域を表わし、そこにおいては(a)この溝の深さは3 nmから光透過性の層の厚さまでの範囲にあり、(b)この光透過性の層の厚さは30から1000 nmまでの範囲にあり、(c)この波形構造の周期は200から1000 nmまでの範囲にあり、(d)この光透過性の層の厚さに対するこの溝の深さの比率は0.02から1までの範囲にあり、そして(e)溝の周期に対する溝の幅の比率は0.2から0.8までの範囲にある。この配置は、使用時に、溝がa)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレント光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折するが、それらは干渉して透過ビームの減少および入射光の異常に高い反射をもたらし、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するか；またはb) 当該ブラットホーム上に入射するコヒーレントな直線偏光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折するが、それらは干渉して透過ビームの殆んど全部の消滅および入射光の異常に高い反射をもたらし、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するかのどちらかのように、形状化し、寸法化しかつ配向している。

【0014】

ここで用いる限りでは、配向とは、直線偏光の電界ベクトルは溝に平行もしくは垂直であることを意味すると理解される。ここで用いる限りでは、コヒーレント光とは、放射線のコヒーレンス長、即ち、入射ビームが規定した位相関係を有する空間的な程度、がブラットホーム厚さに比較して大きいことを意味すると理解される。

【0015】

エバネッセント場は入射ビームの波長次元内で指数的に減弱する(1 μ m以下)。

【0016】

本発明の一つの重要な態様は、その中でいわゆるエバネッセント共鳴が創成され得るブラットホームの使用である。異常反射は、例えば表題"Theory and applications of guided mode resonance filters" by SS Wang and R Magnusson in Applied Optics, Vol. 32, No 14, 10 May 1993, pages 2606 to 2613の論文および表題"Coupling gratings as waveguide functional elements" by O. Parriaux et al, Pure & Applied Optics 5, (1996) pages 453-469の論文中の先行技術において、理論的に記載されている現象である。これらの論文中で説明されているように、共鳴現象は平面的な誘電層の回折格子の中で起こり得るが、ここでは反射および透過波間での光学的エネルギーの殆んど100%の交換が、回折格子の溝が十分な深さを有し、波形構造へ入射する放射線が特定の角度にあるときに、起こる。本発明では、この現象がブ

プラットフォームの検知区域で利用されるが、そこではその検知区域は十分な深さの回折溝を含み、光はエバネッセント共鳴がその検知区域で起こるような角度で、プラットフォームの検知区域に入射するようにされている。これが、検査中の試料を励起するために用いられる増強したエバネッセント場を検知領域において創成する。上述の100%交換は、平行ビームおよび直線偏光コヒーレント光で起こり、増強したエバネッセント場の効果はまた、非平行集束レーザービームの非偏向光でも達成され得ることは注目すべきである。

【0017】

共鳴条件においては、個別のビームは、透過ビームが相殺され(破壊的干渉)かつ反射ビームが干渉して構築的に異常な高反射を発生させるような方式で、干渉する。

【0018】

上述した波形層構造に対し適当なパラメーターを選択することにより、励起エネルギーは、高度に局在化されたままに残る。このような構造は、フォトリックバンドギャップ構造、その電磁放射がいかなる方向にも伝播できないような屈折率の周期性の空間変異を有する材料、として文献に記載されている。フォトリックバンドギャップ構造は、高度に局在化したモードの出現を可能にする、例えば、表題"Localization of One Photon States" by C. Adlard, E. R. Pike and S. Starkar in Physical Review Letters, Vol. 79, No 9, pages 1585-87 (1997)の論文を参照。このような構造は、 μm レジームにおいて、モード局在化に対応する極めて大きな伝播損失を示す。

【0019】

本発明のプラットフォームは、例えばガラスもしくはポリマーから構築される光学的に受動的なプラットフォームとは対照的に、光学的に能動的と考え得る。ここで光学的に能動的とは、エネルギー閉じ込めにより励起ビームの電磁場が増加することを意味する。

【0020】

プラットフォームの基板は、ガラス、 SiO_2 、水晶、 Si のような無機物質から形成されてもよい。これに代えて、基板はポリマー、好ましくはポリカーボネート(PC)、ポリ(メチルメタアクリレート)(PMA)、ポリイミド(PI)、ポリスチレン(PS)、ポリエチレン(PE)、ポリエチレンテレフタレート(PET)もしくはポリウレタン(PU)、のような有機物質から形成され得る。これらの有機物質は特にポイントオブケア(POC)および個人別医療の応用で好ましいが、それはガラスはそのような環境では許容されないからである。プラスチック基板は、ガラスよりずっと容易に構築(打ち出し)できる。一つの実施例では、基板はガラスから形成されている。

【0021】

光透過性の層は無機物質から形成してもよい。これに代えて、それを有機物質から形成することもできる。一つの実施例では、光透過性の層は、 Ta_2O_5 、 TiO_2 、 Nb_2O_5 、 ZrO_2 、 ZnO もしくは HfO_2 のような金属酸化物である。光透過性の層は非金属である。

【0022】

これに代えて、光透過性の層は、ポリアミド、ポリイミド、ポリプロピレン(PP)、PS、PMMA、ポリアクリル酸、ポリアクリルエーテル、ポリチオエーテル、ポリ(フェニレンスルフィド)およびそれらの誘導体のような有機物質からも作り得る(例えば、S S. Hardecker et al., J of Polymer Science B: Polymer Physics, Vol. 31, 1951-53, 1993を参照)。

【0023】

回折溝の深さは3 nmから光透過性の層の厚さまで、そして好ましくは10 nmから光透過性の層の厚さまで、例えば30 nmから光透過性の層の厚さまでの範囲にあればよい。光透過性の層の厚さは、30から1000 nmまで、例えば50から300 nmまで、好ましくは50～200 nmの範囲にあればよく、波形構造の周期は、200から1000 nmまで、例えば200から500 nmまで、好ましくは250～500 nmの範囲にあればよく、光透過性の層の厚さに対する溝の深さの比率は、0.02から1まで、例えば0.25から1まで、好ましくは0.3から0.7までの範囲にあればよく、そして溝幅の溝周期("負荷サイクル")に対する比率は、0.2から0.8まで、例えば0.4から0.6までの範囲内にあればよい。

【0024】

溝は一般的に断面が長方形であってもよい。これに代えて、溝が正弦曲線状もしくは鋸歯断面状であってもよい。表面構造は一般的に対称的であってもよい。好ましい形状としては、長方形、正弦曲線状および台形断面が挙げられる。これに代えて、溝が鋸歯断面(ブレード回折格子)状もしくは他の非対称的形狀であってもよい。他の態様では、溝の深さは、例えば周期的な変調で変化してもよい。

【0025】

ブラットホームは正方形もしくは長方形でよく、そして溝はその表面を覆うようにブラットホームに沿って直線的に伸展してもよい。これに代えて、ブラットホームは円盤状であってもよく、そして溝は円形もしくは線形であってもよい。

【0026】

溝は基板の表面に形成してもよい。これに代えて、溝は光透過性の層の表面上に形成してもよい。さらに代わりとして、溝は境界面である基板の表面上および光透過性の層の表面上の両方で形成してもよい。

【0027】

単一検知区域の波形表面は、一つの特定の励起波長および一つの特定のタイプの偏向に対して最適化してもよい。適当な手段、例えばお互いに平行もしくは垂直である幾つかの周期的構造の重ね合わせによって、ブラットホームの多重波長使用("多色"適用)に適する周期的表面の軽減が得られる。これに代えて、一つのブラットホーム上の個々の検知区域を、異なる波長および/もしくは偏向の配向に対して最適化してもよい。

【0028】

光透過性の層の表面は、それぞれが一つもしくは複数の捕獲要素を持ち得る一つもしくは複数の波形検知区域を含み得る。

【0029】

それぞれの捕獲要素は、親和性反応ができる個別および/もしくは混合物の捕獲分子を含み得る。個別の捕獲要素の形は、長方形、円形、楕円形もしくは他のいずれの形であってもよい。個別の捕獲要素の領域は、 $1\mu\text{m}^2$ と 10mm^2 の間、例えば $20\mu\text{m}^2$ と 1mm^2 の間、そして好ましくは $100\mu\text{m}^2$ と 1mm^2 の間である。捕獲要素は、正規二次元アレーで配置してよい。捕獲要素の中心から中心(c t c)までの距離は、 $1\mu\text{m}$ と 1mm の間、例えば $5\mu\text{m}$ と 1mm の間、好ましくは $10\mu\text{m}$ と 1mm の間であってもよい。

【0030】

検知区域当たりの捕獲要素の数は、1と1,000,000の間であり、好ましくは、1と100,000の間である。他の様態では、ブラットホーム上に固定化すべき捕獲要素の数は限定されなくてもよく、例えば遺伝子、DNA配列、DNAモチーフ、DNAマイクロサテライト、単一ヌクレオチド多型(SNPs)、興味ある種もしくは生物のゲノムを構成するタンパク質もしくは細胞断片、またはそれらの選択もしくは組み合わせの数に対応してもよい。さらなる態様では、この発明のブラットホームは、二つもしくはそれ以上の種、例えばマウスおよびラットのゲノムを含んでいてもよい。

【0031】

ブラットホームは、捕獲分子の固定化を可能にするために、光透過性の層の表面に配置する接着促進層を含んでもよい。接着促進層はまた、さらにアッセイおよび検出効率を増加するための微小孔層(セラ

ミックス、ガラス、Si)または、捕獲要素の固定化および試料分析を行うための培地として使用でき、それによってさらにアッセイおよび検出効率を増加させるか、もしくは、ゲル電気泳動という意味で、アナライト混合物の分離を可能にするゲル層を含んでもよい。ブラットホームは複数の検知区域もしくは領域で形成してもよく、それぞれはそれ自体の回折溝を有する。

【0032】

この発明のブラットホームの一つの特色は、光透過性の層に入る光エネルギーが、波形ブラットホームの性質により即座に層外に回折されることである。それ故に、導波は起こらないか、無視される程度である。典型的には伝播距離は、 $100\text{ }\mu\text{m}$ もしくはそれ以下であり、好ましくは $10\text{ }\mu\text{m}$ もしくはそれ以下である。これは大変驚くほど短い距離である。伝播距離は、その途上で放射線のエネルギーが $1/e$ に低減する距離である。

【0033】

この発明の第三の態様は、当該第一もしくは第二の態様に従うブラットホームを備えた試料分析用の器具、光ビームを発生させて、それがエバネッセント共鳴をブラットホームで起こさせ、それによってブラットホームの検知区域中に増強したエバネッセント場を創成させるところの角度でブラットホーム上に入射させるように、ビームを指示する手段、ならびにブラットホームの検知区域に配置される物質の特質を検出するための手段を提供する。共鳴条件の創成に適する角度の範囲は、ブラットホームへの入射光に対する全計の反射の角度によって限定される。好ましい角度は、 45° 以下、例えば 30° もしくはそれ以下、例えば 20° から 10° もしくはそれ以下、例えば 0.1° から 9.9° である。角度は正常入射に等しいかおおよそでよい。光を発生させる手段は、コヒーレントレーザービームを放射するためのレーザーを含んでもよい。他の適当な光源としては、そこで放射されたスペクトル線が、十分なコヒーレント長を有する放電ランプもしくは低圧ランプ、例えば、水銀もしくはキセノンランプ、および、光一放射ダイオード(LED)が挙げられる。器具はまた、それが角度 θ でブラットホームに入射するようにレーザービームを指示するための光学エレメント、および例えば、直線偏光の透過に適合したコヒーレントビームの偏向面を形作るためのエレメントを含んでもよい。角度 θ は式 $\sin \theta = n - \lambda / \Lambda$ によって定義され得るが、そこでは Λ は回折溝の周期であり、 λ は入射光の波長であり、そして n は光透過性の層の有効屈折率である。

【0034】

使用し得るレーザーの例は、気体レーザー、固体状態レーザー、染料レーザー、半導体レーザーである。必要により、放射波長は非線形光学的エレメントを使って倍増できる。特に適切なレーザーは、2

75と753nm間の波長で放射するアルゴンイオンレーザー、クリプトンイオンレーザー、アルゴン／クリプトンイオンレーザーおよびヘリウム／ネオンレーザーである。極めて適切なレーザーは、小寸法かつ低電力消費のダイオードレーザーもしくは半導体物質の周波数倍増レーザーである。

他の適当なタイプの励起は、ブラットホーム上で認識要素を個別に励起し得るVCSEL品(垂直空洞表面放射レーザー)を使用する。

【0035】

検出手段をアレンジして、蛍光のようなルミネセンスを検出し得る。親和性パートナーは、Foerster蛍光エネルギー移動(FRET)がアナライト分子の捕獲分子への結合において起こり得るような方式で、標識することができる。ルミネセンス強度の最大値は、レーザーシステムの屈折率値およびそれに対応するフレネル係数に依存して、最も高い異常反射の位置と比べて若干ずれるかもしれない。

【0036】

試料は、未希釈もしくは添加溶媒と共のどちらかで用いてもよい。適当な溶媒としては、水、水性緩衝溶液、タンパク質溶液、天然もしくは人工的オリゴマーもしくはポリマー溶液、および有機溶媒が挙げられる。適当な有機溶媒としては、アルコール、ケトン、エステル、脂肪族炭化水素、アルデヒド、アセトニトリルもしくはニトリル、が挙げられる。

【0037】

可溶化剤もしくは添加物を含んでもよく、ピロ炭酸ジエチル、フェノール、ホルムアミド、SSC(クエン酸ナトリウム／塩化ナトリウム)、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、緩衝試薬、酵素、逆転写酵素、リボヌクレアーゼ、有機もしくは無機ポリマーのような、有機もしくは無機化合物または生化学的反応試薬であってもよい。

試料はまた、色素粒子、分散剤、ならびに天然および合成オリゴマーもしくはポリマーのような、用いた溶媒に溶けない組成物を含んでもよい。

【0038】

マーカーとして用いるルミネセンス染料は、アナライト溶液中に存在するおよび／もしくはブラットホームに付着する一重もしくは多重の親和性結合パートナー(もしくは、それらの誘導体)に、化学的にもしくは物理的、例えば静電的に、結合し得る。親和性反応に関係する、DNA、RNA、糖類、タンパク質もしくはペプチドのような天然由来のオリゴマーもしくはポリマー、ならびに合成オリゴマーもしくはポリマーの場合には、挿入性染料もまた適している。発光団は、ビオチン／アビジン結合のような生物学的相互作用もしくはHISタグカップリングのような金属複合体形成を経て、アナライト溶液中に

存在する親和性パートナーと付着し得る。

【0039】

一重もしくは多重の結合パートナーの存在を定量的に測定するために、アナライト溶液中に存在する親和性パートナーに、ブラットホーム上に固定化された捕獲要素に、もしくはアナライト溶液中に存在する親和性パートナーおよびブラットホーム上に固定化された捕獲要素の両者に、一重もしくは多重のルミネセンスのマーカ―を付着させてもよい。

【0040】

ルミネセンスのマーカ―の分光学的性質は、Foersterエネルギー移動もしくは光誘起電子移動のための条件に合致するように選択し得る。それから、アクセプターおよびドナーの距離および濃度に依存性のルミネセンスをアナライト分子の定量化に使用し得る。

【0041】

親和性結合パートナーの定量化は、親和性反応に関係する分子に結合するようなドナーおよびアクセプター間の、分子間および／もしくは分子内相互作用に基づき得る。親和性結合パートナーに共役的に結合するルミネセンスドナーおよびアクセプターの分子内集合体、親和性反応においてドナーおよびアクセプター間の距離を変化させる分子ビーコン(S. Tyagi et al., Nature Biotechnology 1996, 14, 303-308)、はまた、アナライト溶液のための捕獲分子もしくは添加物として用い得る。加えて、pHおよび電位的に感受性の発光団もしくは酵素活性に感受性の発光団は、蛍光性誘導体の酵素介在による形成のように用い得る。

トランスフルオロスフェアもしくはそれらの誘導体は蛍光標識のために使用し得て、そして化学ルミネセンスのもしくは電子ルミネセンスの分子はマーカ―として使用し得る。

【0042】

以下の誘導体ポリフェニルおよびヘテロ芳香族化合物、スチルベン、クマリン、キサンテン染料、メチン染料、オキサジン染料、ローダミン、フルオレセイン、クマリン、スチルベンパイレン、ペリレンシアニン、オキサシアニン、フタロシアニン、ポルフィリン、ナフトロシアニン、アゾベンゼン誘導体、ジスチリルビフェニル、遷移金属錯体、例えば、ポリピリジル／ルテニウム錯体、塩化トリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム、塩化トリス(1,10-フェナンスロリン)ルテニウム、塩化トリス(4,7-ジフェニル-1,10-フェナンスロリン)ルテニウムとポリピリジル／フェナジン／ルテニウムとの錯体、オクタエチル白金-ポルフィリン、ユーロピウムおよびテルビウム錯体のような、400 nmから120

0 nmの範囲のルミネセンスを有し、一つまたはそれ以上の親和性パートナーに付着するために官能化もしくは修飾されているルミネセンスの化合物は、ルミネセンスのマーカーとして使用し得る。

【0043】

血液もしくは血清の分析に適するものは、400 nmから1000 nmの範囲に吸収および放射波長を有する染料である。さらに、二個または三個の光子励起に適する発光団を使用できる。

【0044】

この発明に適する染料は、共有結合するための官能基、例えばフルオレセインイソチオシアネートのようなフルオレセイン誘導体を含んでもよい。

また適当なものは、Amersham Life Science, Inc. Texas, and Molecular Probes Inc.から市販されている官能性蛍光染料である。

【0045】

他の適当な染料としては、RNAもしくはDNA鎖に酵素的に組み込まれ得るデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)によって修飾された染料が挙げられる。

さらに適当な染料としては、Quantum Dot ParticlesもしくはBeads(Quantum Dot Cooperation, Palo Alto, CA)もしくはそれらの誘導体または一つのかつ同一の規定された波長で励起し得る遷移金属錯体の誘導体が挙げられ、そして誘導体は識別可能な波長においてルミネセンス放射を示す。

【0046】

アナライトは、直接的に結合したルミネセンスのマーカーを経るか、もしくは間接的に添加したルミネセンスでマークした種との競合によるか、または一重および／もしくは多重のアナライト種および／もしくは捕獲要素に結合するマーカーとして用いるルミネセンスドナーとルミネセンス／電子アクセプターとの濃度、距離、pH、電位もしくは酸化還元電位依存性の相互作用によるかのいずれかによって、検出され得る。ドナーのルミネセンスおよび／もしくは消光剤のルミネセンスはアナライトの定量化のために測定できる。

【0047】

同様にして親和性パートナーは、電子移動もしくは光誘導電子移動がアナライト分子の捕獲分子と結合する際に蛍光の消光に導くような方式で標識し得る。

ルミネセンスの適当な検出器としては、CCDカメラ、光電子増倍管、アバランシェフォトダイオード、フォトダイオード、ハイブリッド光電子増倍管が挙げられる。

検出手段をアレンジして、屈折率における付加的变化を検出し得る。

【0048】

一つの共通プラットフォーム上にあるその検知区域もしくは全ての検知区域を照射するように、入射ビームを配置し得る。これに代えて、分析すべき検知区域の小さな副部位のみを照射するようにビームを配置し、そしてプラットフォームの検知区域を走査するために相対的移動を実行できるように、ビームおよび／もしくはプラットフォームを配置することができる。

【0049】

したがって、単一露光段階で全検出区域のルミネセンスシグナル強度を獲得するように、検出手段を適切な方式でアレンジしてもよい。

これに代えて、検知区域を段階的に走査するために、検出および／もしくは励起手段をアレンジしてもよい。

【0050】

器具は、試料を検知区域と接触させるためにプラットフォームの検知区域とは反対に位置させるカートリッジを含んでもよい。このカートリッジは、試料の作成、希釈、濃縮、混合、生物／化学反応、分離を小型化フォーマット(WO97/02357参照)で実行するために、さらなる手段を含んでもよい。この器具は、検査すべき複数の試料を含むためのマイクロタイタータイプ装置を含んでもよい。

【0051】

本発明の第四の態様は、一つの試料もしくは複数の試料を分析するための方法を提供するが、それは、試料を当該第一もしくは第二の態様に従ってプラットフォームの検知区域と接触させること、エバネッセント共鳴をプラットフォームの検知区域内で起こさせるように光ビームでそのプラットフォームを照射すること、およびその検知区域から発散する放射線を検出することを含む。この方法は、検査下の試料に蛍光誘起物質を加えること、および増強したエバネッセント場による試料の励起によって当該試料に誘導された蛍光を検知することを含み得る。これに代えて、この方法は、検査下の試料に蛍光を誘起もしくは消光する物質を加えることおよび／または検査下の試料の蛍光性もしくは消光性誘導体への移動、そして増強したエバネッセント場による励起によって検知プラットフォームに結合した当該試料に誘導された蛍光を検知することを含み得る。

【0052】

それぞれの検知区域もしくは領域がそこに一つ以上のタイプの捕獲要素もしくは分子を付着しているセンサープラットフォームを提供することは、新規なかつ発明力のある概念であると信じられている。この概念は、プラットフォームをエバネッセント共鳴モード、もしくは導波のようなより従来型のモードに設

計するかどうかに応用している。かくして、本発明の他の態様に従って、試料分析で用いるためのプラットフォームが提供され、当該プラットフォームは一つもしくはそれ以上の検知区域もしくは領域を有し、それぞれは、プラットフォームがコヒーレント光で照射されるときに相互作用して親和性反応の指標を提供することができるものの一つもしくは複数の捕獲要素を受け取るためのものであり、そこではそれぞれの捕獲要素は二つもしくはそれ以上のタイプの捕獲分子を含む。

【0053】

さてこの発明を添付の図面を特定の基準にするのみの実施例として記載する。この図面においては：図1は、光学的パラメーターを分析するための品質制御器具および本発明に従ったプラットフォームのエバネッセント共鳴条件の概略図である；

図2は、本発明に従ったセンサープラットフォームの概略図である；

図3は、プラットフォームとの関連においてエバネッセント場プロフィールを示す概略図である；

図4aおよび4bは、チップカートリッジを示す概略図である；

図5は、本発明の一つの実施例におけるアレイレイアウトを示す；

図6は、本発明の一つの実施例に従って蛍光を測定するために用いるレイアウトを図式的に示す；

図7は、先行技法および本発明によって得られた結果の比較を示す。

図8は、プラットフォームの別の形を図示する。

図9aから9cは、実施例5に記載の共鳴条件下で本プラットフォームを用いて、30 pmのPMアナライトのインキュベーション、再生、そして30 pmのMMアナライトのインキュベーションの後に得られた蛍光画像を示し、そして図10は、実施例6に記載のエビ蛍光および共鳴条件下で本プラットフォームを用いて得られた蛍光画像およびデータを示す。

【0054】

この発明は、試料中で励起されたルミネセンスの測定に関して記述されるであろう。この測定は、本発明の一つの態様を構成するセンサープラットフォームの使用を伴うが、このようなプラットフォームの使用が記載される特定の応用に必ずしも限定されるものではないことは、高く評価されるであろう。プラットフォームを詳細に記載する前に、プラットフォームを用いて試料のルミネセンスを測定することができる方式の一般的な用語について説明する。

【0055】

以下は、本説明で使用されるであろう用語の定義である：プラットフォーム：一つもしくは複数の検知区域を含む全部の変換器／チップ検知区域：共鳴効果によってエバネッセント場を創成しかつ一つもしくは

は複数の捕獲要素を含むことができる全部の波形区域捕獲要素：一つもしくは種々の捕獲分子を含む個別の検知点捕獲分子：親和性反応ができる個別の分子以下の実施例においては、全ての温度は摂氏度であり、かつ未補正である。

【0056】

図1について言及すると、本発明の態様に従うブラットホームは、(10)で示され、レーザー(11)からコヒーレント光を受け取ることができ、このレーザー光は、拡張した平行ビーム(16)を作成する一組のレンズ(12、14)によって拡張されていて、そして偏光器(18)によって偏光されている。後でより詳細に説明するように、ブラットホーム(10)は、そこに捕獲分子が付着する検知区域を有する。光の波長は、典型的にはUVからNIR域の範囲、好ましくは350nmから1000nmの間にあるであろう。

【0057】

器具はまた、ブラットホーム(10)を通じて伝播された光を検出できる検出器(20)、その反射光を検出するためのCCDカメラ(21)およびデータ処理ユニット(22)を含む。

【0058】

器具の使用では、高度に平行な、拡張した、コヒーレントな、直線偏光したレーザービーム(16)を、ブラットホーム(10)の検知区域に入射させるようにし、そしてこのブラットホームを通じて透過した光を検出器(20)により検知し、反射光をCCDカメラ(21)によって記録する。拡張した励起ビームの直径は、ブラットホーム(10)のサイズを超えている。検出器(20)がブラットホームを通じて透過する光を有効に検出しなくなるまで、ビームのブラットホームへの入射角度をブラットホームの回転によって調整する。これは、そこでエバネッセント共鳴がブラットホームの検知区域で起こっている、共鳴位置の存在を示す。この条件下で、カメラ(21)によって記録された反射光の強度は最大値に達し、カメラからのデータが、処理のためにデータ処理ユニット(22)によって取得される。

【0059】

さて図面の図2に移ると、ブラットホーム(10)の一つの実施態様は、トップの表面中に複数の溝(31)がエッチングされているガラス基板(30)を備えている。光透過性の金属酸化物の層(32)を基板(30)の上部表面に固着させ、その層(32)はまた、その中に溝(33)を形成している。基盤(30)は、Schottによって製造されたガラスAF45のようなガラスから、例えば形成でき、そして典型的には、0.5mm~1.0mmの厚さを有する。他の有機もしくは無機物質も、それが光透過性であるならば、この基板

に使用できることは高く評価されるであろう。

【0060】

光透過性の層は、波長633nmでおおよそ2.2の高い屈折率、すなわち基板の屈折率よりも有意に高いものを持つ、 Ta_2O_5 のような誘電性の透明な金属酸化物の膜である。この層の厚さは典型的には50から200nmもしくはより大、例えば50から300nmの範囲にあるであろう。波形構造(31)および(33)は、200~1000nm、例えば200から500nm、典型的には250~500nmの範囲の周期を有する。波形構造／回折溝の深さは、3nmから光透過性の層の厚さまで、好ましくは10nmから光透過性の層の厚さまでの範囲であればよい。金属酸化物は、 Ta_2O_5 、 TiO_2 、 Nb_2O_5 、 ZrO_2 、 ZnO もしくは HfO_2 のような、多数の例のいずれでもよい。

【0061】

図2に示したようなブラットホームでは、偏光したレーザー光の平行ビームがある特定の入射角度でその上に入射するとき、異常反射として公知の一つの効果が層(32)内に起こる。この効果が実質的に起こるとき、光はブラットホーム(10)を通じて透過されず、コヒーレントレーザー光が金属酸化物の極めて薄い層(32)に閉じ込められるように、すべての光は、有効に層(32)内に反射される。得られた高レーザー場は、部分的に層(32)から漏出し、層(32)の表面もしくは近傍にある蛍光物質をエバネッセント的に励起するところのエバネッセント場を創成する。ある特定の深さもしくはそれ以上のものを有する回折溝(31, 33)が使用されるときにのみ、この共鳴条件が達成され得るということは注目すべきであり、そしてこのような波形構造の放射線損失は非常に高いために、好ましい波長範囲にあるいかなる電磁放射の導波も、この金属酸化物の層(32)内で起こらないということもまた注目すべきである。溝の深さは少なくとも10nmであることが好ましいが、しかしエバネッセント共鳴はより浅い溝で増大し始める。しかしながら、検査すべき試料が共鳴の創成される層(32)の近傍にあるならば、増強したエバネッセント場は、試料中の蛍光のようなルミネセンスを励起するために使用し得る。

【0062】

本ブラットホームの重要な特色は、共鳴位置でのこのエバネッセント場の振幅が、先行技術の配置(オフ共鳴条件に対応するエビ蛍光)のものよりも、有意におおよそ100のオーダーで大きいことである。

【0063】

このことは、試料から創成され得るルミネセンス、例えば蛍光、の強度がまた100の係数で増加することを意味する。ブラットホームのこの機能は、光を回折する体積格子として働く回折構造の観点から、そして回折ビームが干渉して共鳴条件を創成し、そこでは最初の境界面から反射される光および層

(3 2)の上部表面であるトップ境界面から反射される光が構築的に干渉して反射最大値を生じるという観点から見る事ができる。共鳴条件下では、レーザーエネルギーは、薄い層(3 2)の厚さに実質的に閉じ込められ、それによって電場強度を増加させる。与えられたレーザー波長および波形構造の周期に対しては、共鳴は角度依存性である。角度依存性の共鳴は、典型的には、 $> 0.1^\circ$ 、好ましくは 0.5° もしくはそれより大きい、例えば 1.0° もしくはそれより大きい最大高の半値幅(FWHM)を有する。この共鳴幅は、溝の深さ、負荷サイクルおよび波形構造の形状に依存する。導波路回折格子のカップリング挙動と比較すると、記載した共鳴のFWHMは多数桁のオーダーでより大きい。

【0064】

回折溝(3 1, 3 3)が、適当な従来の技法によってブラットホーム上に形成され得ることは高く評価されるであろう。これを達成する一つの方式は、写真技法によって溝をエッチングすることである。ここでは、フォトリソ組成物を基板表面におおよそ $1\mu\text{m}$ の深さで固着させ、それから、二ビーム干渉法／ホログラフィーまたは相マスクの使用か、のいずれかによって溝の形成に対応する周期構造をレジストに書き込み、そしてそれから、アルゴンガスを用いる反応性イオンエッチング技法によりレジストをエッチングし、最後に残存するフォトリソ物質を表面から剥ぎ取る。この技法は溝(3 1)および溝(3 3)の両者の形成に使うことができる。波形構造を組み込む他の方式としては、エンボス加工、電子ビーム書き込み、レーザーアブレーション、LIGAプロセスが挙げられる。

【0065】

図2を基準にして記載されたタイプのブラットホームを、それが図6に図示されたような測定で用いられるように作成するためには、多くの手順に従うべきである。

【0066】

第一段階はブラットホームを清浄にし、表面から不純物を除去することである。クリーニング手順は、多くの手段、例えば紫外線クリーナーにより、プラズマクリーニングにより、もしくは酸、塩基、溶媒、ガスおよび液体のような物質を用いる化学的クリーニングによって達成することができる。

【0067】

一度ブラットホームが清浄にされたならば、次の段階は金属酸化物層の表面へ接着促進剤の層を塗布することである。この層は、ブラットホームに固着すべき捕獲要素が金属酸化物層それ自体に容易に接着しないかもしれないため、ブラットホームに塗布される。この層を形成する幾つかの方式がある。一つの方式は、網状のシラン分子の層を形成することであり、そして別の方式は自己集合単層(SAM)として公知のものを使うことである。これらは、当業者にとっては明白であろう公知技法である。例えば、

液相もしくは気相を伴い得るシラン化は Colloids and Interface Science 6, L Boksanyi, O Liardon, E Kovats, 1976, 95-237 に記載されている。自己-集合単層の形成は、例えば "Ultra thin organic films" by Abraham Ulman, 1991, Academic Press Inc. に記載されている。加えて、一反応性基によるチップ表面および適当なリンカーによる捕獲分子の化学修飾 (U. Maskos and E. M. Southern, Nucleic Acids Research 1992, vol. 20, 1679-84) - 光反応性リンカー/基による表面および捕獲分子の修飾 (WO 98 / 2 7 4 3 0 および WO 9 1 / 1 6 4 2 5) - クーロン相互作用を経由する固定化 (EP 0 4 7 2 9 9 0 A 2) - キレート反応におけるタグ (例えば、タンパク質-タグ、HIS-タグ) を経由するカップリングおよび、例えば Methods in Enzymology Academic Press, New York, Klaus Mosbacher (ed.), Vol. 137, Immobilised enzymes and Cells, 1988 に記載のような、種々のさらなる方法 - 捕獲分子もしくは誘導体化した捕獲分子の直接的カップリング、または捕獲分子もしくは誘導体化した捕獲分子の化学リンカーもしくは光化学的リンカーを経由する間接的カップリングを可能にする官能性/反応性基を含む接着促進層のプラズマ誘導固定化/生成、のような、捕獲要素の固定化のために利用できる方法がさらにある。

【0068】

接着促進層は、例えば 3-(グリシドオキシプロピル)トリメトキシシラン (GOPTS) によるシラン化によって、作成することができる。アミンのような求核基を含む化合物は、共有的に固定化するために、シランのエポキシ官能基と反応させることができる。このようなシラン化はそれ故に、抗体はアミノ酸からなるため、多重のアミノ基を含む抗体の固定化に例えば用いることができる。加えて、応用実施例 4 (SNP の識別) に示すように、捕獲分子としての DNA/RNA/PNA 鎖はまた、これらの捕獲分子を共有的にプラットフォームに付着させるために、アミノ基で修飾することができる。この実施例では、アミノ官能基を持つオリゴヌクレオチドは、プラットフォームの表面で共有的に固定化されてきている。しかしながら、他のタイプの捕獲分子をこの目的のために修飾することができる。

【0069】

加えて、表面の性質を変化させるために、接着促進層をさらに化学的に修飾することができる。例えば、GOPTS-シラン化プラットフォームは、プラットフォームの疎水性/親水性バランスを操作する、例えば、プラットフォームの接触角を変えるために、官能化された飽和もしくは不飽和有機/ヘテロ-有機/無機分子/誘導体と反応させることができる。さらに、イオン性もしくは潜在的にイオン性の化合物を用いて、プラットフォームの表面に正もしくは負電荷を創成することができる。共役的にもしくは物

理吸着的に、または荷電分子のクーロン相互作用によって、またはそれらの組み合わせによって、捕獲分子をこのような修飾された表面／プラットフォームに結合させることができる。これは、下の応用実施例2で例示され、そこでは、DNA／RNA／PNA捕獲分子を固定化するために、3-アミノ-1-ブロパノールを用いて、第二の反応工程でGOPTS-シラン化プラットフォームの表面特性を修飾している。この実施例では、プラットフォームの表面に導入した窒素(アミン基)がプロトンによって四級化され、それ故にDNA(多電解質の性質)の負電荷と相互作用する正電荷を付与する。3-アミノ-1-ブロパノールの代わりにまた、アミンの他の有機誘導体、例えば脂肪族アミンもしくは分岐脂肪族アミン、または芳香族もしくは非芳香族の環状構造を含むアミン、またはヘテロ原子を含むアミン、または官能基を含むアミン、またはそれらの組み合わせを含むアミンを捕獲分子、例えば、DNA／RNA／PNA鎖の固定化のために用いることができる。

【0070】

炭化水素鎖を付与する官能化された有機分子を用いてプラットフォームをより疎水性にすることができ、極性基を用いてプラットフォームをより親水性にすることができ、または、イオン性基もしくは潜在的イオン性基を用いて電荷を導入することができる。例えば、ポリエチレングリコール(PEG)もしくはその誘導体を用いてプラットフォームを親水性にすることができるが、それはタンパク質のプラットフォーム／表面への非特異的吸収を阻止する。

反応性もしくは光反応性の基をプラットフォームの表面に付着させて、これをさらなる反応段階のためのアンカー基として役立つさせてもよい。

【0071】

抗体の固定化に適する接着促進層としてのSAMは、プラットフォームの両親媒性アルキルホスフェート(例えば、リン酸ステアリル)処理で、得ることができる。このホスフェートの頭部基は、プラットフォーム表面で水酸基と反応し、そして両親媒性アルキルホスフェートの規則性モノレイヤーの形成に導く。疎水性アルキル鎖はプラットフォームの表面を疎水性にし、かくして応用実施例6で示すように、抗体の物理吸着を可能にする(多重化したイムノアッセイ)。

【0072】

SAMをまた、他の捕獲分子、例えばDNA／RNA／PNA鎖、の固定化のために用いてもよい。この場合に、例えばアミン基もしくはエポキシ基で修飾された、両親媒性ホスフェート／ホスフェートもまた用いることができる。直接SAMに、例えば、アミンで修飾されたSAMに、または、プラットフォームがアミンの有機誘導体、例えば脂肪族アミンもしくは分岐脂肪族アミン、または芳香族もしくは

非芳香族の環状構造を含むアミン、またはヘテロ原子を含むアミン、または官能基を含むアミン、またはそれらの組み合わせを含むアミン、またはいかなる他の有機、ヘテロ有機、および／もしくはは無機分子(例えば、エポキシで修飾したSAM)と反応させた後に、のいずれかで捕獲分子をカップリングさせることができる。

【0073】

接着促進層は、表面特性、例えば、疎水性、接触角度、電荷密度を操作するために多重層からなってもよい。加えて、上述の方法のどれかによりプラットホームに付着した層は、次の、後続層のため、または捕獲分子もしくは誘導体化された捕獲分子のカップリングのためのいずれかに必要とされるところの化学的機能性を提供もしくは導入し得る。化学的リンカー分子もしくは光化学的リンカーの付着はまた、捕獲分子のプラットホームへの付着を可能にする中間層と見なし得る。

【0074】

異なる機能性をもつ層／分子とのこの制御された組み合わせは一般的に、超分子化学 (J-M. Lehn, Supramolecular chemistry-Scope and perspective. Molecules, supermolecules, and molecular devices, (Nobel Lecture, 8. 12. 1987), Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 27, 89, 1988.) に帰するとされている。得られた超分子構造は、個別の層のために用いる個別の分子の機能性とは異なる機能性を提供する。本発明のためには、中間層はまた、捕獲分子もしくは修飾された捕獲分子がプラットホームに付着される以前に、Foersterエネルギー移動(FRET)もしくは光誘導電子移動という意味でのエネルギードナーもしくはエネルギーアクセプター／失活剤または電位感受性発光団のいずれかとして用い得る発光団を、このような層システムに導入できる。

【0075】

上述の表面処理の方法に対して、以下の有機もしくは無機の分子およびそれらの誘導体を用いることができる：アミン、修飾アミン、ジェファミン(jeffamines)、脂肪族アミン、アルコール、酸、アルデヒド、ケトン、アミド、酸無水物、ホスフェート、ホスホネート、スルフェート、スルフォネート、チオール、ヘテロ原子含有化合物、芳香族および脂肪族有機官能化分子、芳香族および脂肪族ヘテロ有機分子、天然および人工ポリマー、シラン、化学的もしくは光化学的な活性基で修飾された分子、それらの誘導体ならびに列挙した種の官能化した、例えばオメガ官能化した誘導体。

【0076】

原理的には、一重もしくは多重の層からなる層構造の形成には、化学的反応性基および／または特異的な物理的もしくは電気化学的な性質(例えば、電荷)を有する化学基が、上述のすべての表面処理で使用する

る分子に必要である。

【0077】

化学的／光化学的相互作用(例えば、付加、求核的／親電子置換、ラジカル反応、縮合、有機／ヘテロ有機／無機のカルボニル誘導体との反応、または光誘導反応、もしくは熱誘導反応、ルイス酸／塩基概念)、ならびに／または 物理的／電気化学的相互作用(例えば、クーロン相互作用、疎水性／親水性相互作用)、ならびに／または 生物学的相互作用(例えば、抗原／抗体、ハイブリダイゼーション、ストレプトアビジン／アビジン－ピオチン相互作用、アゴニスト／アンタゴニスト相互作用)、ならびに／または 光化学的／光物理的相互作用のいずれかを、このような層システム／接着促進層に組み込まれる分子／成分間のカップリングに使用し得る。

【0078】

接着促進はまた、ブラットホームの表面上に微孔性の層もしくはゲルの固着によって達成することができ、この微孔性の層もしくはゲルは、捕獲要素の固着を助長し、必要とされるインキュベーション時間を短縮しかつ後の測定の感度を増強する。この微孔性の層は、ポリマー、モノマー、分子集成体および超分子集成体のような有機化合物から成り得るか、もしくはそれはガラス、水晶、セラミック、シリコンおよび半導体のような無機化合物から成り得る。

【0079】

接着促進層を、例えば、3-(グリシドオキシプロピル)トリメトキシシラン(GOPTS)の使用するシラン化によって作成してもよい。この接着促進層は、表面性質を変えるため、さらに化学的に修飾してもよい。例えば、GOPTS-シラン化ブラットホームは、ブラットホームの疎水性／親水性バランスを操作するために官能化された飽和もしくは不飽和有機化合物と反応させてもよく、そしてそれによってブラットホームの接触角を変える。

【0080】

一度接着促進層がブラットホーム上に形成されると、一つもしくは複数の追加的な清浄段階が、このような層の作成に用いた過剰の化学物質を除去するために必要となるであろう。その清浄後、ブラットホームは捕獲要素を受け取る用意が整う。

【0081】

二次元アレーの捕獲もしくは認識要素を、先にブラットホーム上に固着させた接着促進層の3-D表面上に形成する。このアレーの捕獲要素は種々の方式で固着し得る。捕獲要素を固着させるために用い得る技法としては、圧電性アクチュエーターを有するインクジェットプリンター、電磁アクチュエー

ター、圧力／ソレノイドバルブアクチュエーターもしくは他のフォース変換器；熱電アクチュエーターを使用するバブルジェット（登録商標）プリンター；もしくはレーザーアクチュエーター；リングピンプリンター；ピンツールスポッター；WO90/03382もしくはWO92/10092に記載のようなオンチップ合成；WO98/27430に記載のような超大規模の固定化ポリマー合成(VLSIPS)；

接着促進層の表面に固定された特別デザインの光反応性基の光活性化／光脱保護；マイクロ接触印刷；マイクロ接触筆記ペン；製図ペンもしくは捕獲要素のパッド移動／刻印；例えばPDMS(ポリジメチキシラン)を用いてPMMAマスターのようなポリマーからの注型によって、または、微小機械的もしくは機械的手段によって、または捕獲要素の局所的配布のためのエッチング技法によってなされる、微小流体工学チャネルおよびフローセル；光アブレーションによる捕獲要素の構造化；または前述の技法の一つもしくは他の光固定化技法のどれかを使用する捕獲要素のゲルパッド上への固着が挙げられる【0082】

プラットフォーム上に固着され得る捕獲もしくは認識要素は多種多様である。一般的に述べると、用いられる捕獲分子は親和性反応ができなければならない。本発明で用い得る認識もしくは捕獲分子の例は以下のとおりである：ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド(およびそれらの化学的誘導体) DNA(二本鎖もしくは一本鎖) a)直線型(およびそれらの化学的誘導体)、b)環状型(例えば、プラスミド、コスミド、BAC、AC) 全RNA、メッセンジャーRNA、cRNA、ミトコンドリアRNA、人工RNA、アプタマーPNA(ペプチド核酸) ポリクローナル、モノクローナル、組み替え型の、改変した抗体、抗原、ハプテン、抗体FABサブユニット(必要により修飾した) タンパク質、修飾したタンパク質、酵素、酵素コファクターもしくは阻害剤、タンパク質複合体、レクチン、ヒスチジン標識タンパク質、ヒスチジンタグ成分(Histag)のためのキレーター、タグ付けタンパク質、人工抗体、分子インプリント、プラスチックポディー膜受容体、全細胞、細胞断片および細胞性下部構造、シナプス、アゴニスト／アンタゴニスト、細胞、細胞内小器官、例えばミクロソーム ベンゾジアゼピンのような小分子 プロスタグランジン 抗生物質、薬剤、代謝物、薬剤代謝物 天然物 炭水化物および誘導体 天然および人工リガンド ステロイド、ホルモン ペプチド 生来もしくは人工ポリマー 分子プローブ 天然および人工受容体 そしてそれらの化学的誘導体 キレート試薬、クラウンエーテル、リガンド、超分子集合体 指示薬(pH、電位、膜電位、酸化還元電位) 組織試料(組織マイクロアレイ)【0083】

捕獲分子の活性もしくは密度は数多くの方式で最適化することができる。その上に固着した捕獲要素を

持つプラットフォームは、印刷した遺伝子座を再水和させるために、規定の期間の間、飽和水蒸気雰囲気の中でインキュベートし得る。これは、捕獲分子の密度を最適化する、即ち、単位区域あたりの利用可能な結合部位を増加させる。引き続いて、インキュベートしたチップは、規定の期間の間、例えば、cDNAの捕獲分子については80℃で1分間、焼付けし得る。このプラットフォームは少量の純水またはいかなる他の適当な液体もしくは溶液で湿らすことにより洗浄し、捕獲要素が過剰の非結合材料により相互汚染さえることを避け得る。これらの操作の後に、ここで作成したプラットフォームは使用するまでデシケーター中に保存し得る。チップを使用する前に、乾燥した捕獲要素を再活性化／再水和し、さらに過剰の非結合捕獲要素／緩衝液の残渣を除去するために、0.1から10mlのハイブリダイゼーション緩衝液もしくは他の適当な溶液／液体で追加的な洗浄をする操作が必要であるかもしれない。DNA捕獲分子の場合には、この洗浄操作は、50および85℃の間の温度で実施するとき、最も効果的であると見出されている。

【0084】

このチップの取扱いのプロセス工程は、例えば、Genomic Solutions Inc., Michigan, USからのGene TAC Hybridizationステーションのようなハイブリダイゼーションステーションを用いることにより自動化することができる。

【0085】

ここで記述されるべき特定の測定技法は、特定の蛍光におけるルミネセンスを伴うものである。測定を行うには、検査すべき試料を、その上に捕獲要素が置かれているプラットフォームの検知区域上に置く。蛍光を得るために、測定をする前に発蛍光団をシステムに加える。発蛍光団は、例えば、標識した親和性パートナーとして試料に加えて得るが、プラットフォーム上の捕獲要素に発蛍光団を付着させることもまた可能である。この測定は、標識した捕獲分子を含む捕獲要素からのまたは／もしくは標識した親和性パートナーからの蛍光発光が検査下のアナライトもしくは試料との相互作用により変更されるという事実に基づいている。異なる励起および発光波数を用い得るが、ここには一つもしくは数個の異なる標識が在り、標識1はコントロール実験用であり、標識2は実験用である。

【0086】

図3は、共鳴位置におけるエバネッセント場のエネルギープロフィールおよびそれが如何に金属酸化物層(32)の表面を越えて伸長して、検知区域の表面のすぐ近辺にある発蛍光団、即ち、捕獲分子に付着した発蛍光団もしくは捕獲分子(38)に結合した分子に付着した発蛍光団を励起することができるように示すかを図式的に示している。このエバネッセント場は、およそ1ミクロン以内でゼロに對数的に減少す

る。

【0087】

分析を行う際に一重もしくは多重の測定がされることが高く評価されるであろう。一つは、試料を捕獲要素に接触させる前のバックグラウンドの測定であり得る。第二の測定は、試料を捕獲要素に接触させるとき／後に行うことができる。多重の試料、例えば、遺伝子発現実験における「コントロール」および「処理した」試料、の比較のために、チップは、応用実施例2に記載するように「コントロール」実験の後で再生することができ、そして、さらなるバックグラウンドの測定および「処理した」試料がチップに適用された後／ときの測定を記録することができる。親和性パートナーの反応速度論に関する情報を得るために、完全なセットの測定をインキュベーション時間および／もしくは洗浄後の時間の関数として記録し得る。そのような測定の典型的な配置を図6に示す。図2に示したプラットホームは、そこでエバネッセント共鳴が得られてプラットホームの表面から発光される蛍光の測定がCCDカメラ(66)を用いて行われる角度に調整される。これは、プラットホーム上に固着した捕獲要素のアレー上のそれぞれの位置から発光する蛍光の指標を提供する。これを分析することにより、捕獲要素と検査下の試料の間に起こっている反応の親和性を推定することができる。

【0088】

図6に示すような配置は、全部のルミネセンス、例えば、蛍光、全体のプラットホームの画像、を測定の間に部品を移動させる必要なく、一回のショットで捕獲する。そのような非走査性の装置は非常に簡単で安価であり得て、そしてポイントオブケアの応用もしくはポータブルシステムに特に適している。もう一つの典型的な配置は、光学エレメントを使ってコヒーレントレーザ光をマイクロメートルの寸法にまで閉じ込めることにより焦点における電界を増加させ、そして一つもしくは複数の検知区域を走査する。

【0089】

広範囲の種類の試料を本技法により分析できることは高く評価されるであろう。一般的に、試料は分析すべき全体の溶液として採取され、そしてこれは検知すべき一つもしくは多くの物質を含む。試料は、精製しかつ処理をした組織の溶液でもよく、もしくは臨床目的の試料を含むバイオブシーおよび治療研究開発から得られる他の材料でもよい。試料はまた、卵黄のような生体媒質、体液もしくは血液、血清および尿のようなそれらの成分であってもよい。その試料はまた、土壌もしくは植物部分のような天然もしくは合成媒体からの表面水、溶液または抽出液、生物学的プロセスからの液体または合成的液体であってもよい。

【0090】

測定を行うためには、図面の図4 aおよび4 bに示されたタイプの試料セルの中に試料を導入してもよい。このセルは、PMMAのようなポリマーから作ったハウジング(41)を備えている。このポリマーは、ブラットホームの寸法に対応する寸法を持つ中心コンパートメント(44)を規定するように機械加工されている。このコンパートメント(44)の中にさらにくぼみを形成して、Oリング(47)により端の周りでシールしたチャンバー(46)を規定する。チャンバー(46)はトップおよび底で開放している。分析すべき溶液は、フローライン(45)を通じてOリング(47)内でチャンバー(46)に導入し得る。フローライン(45)内の流れはバルブ(43)により制御することができる。セルはカバー(49)を含むが、これはハウジング(41)を覆って置かれかつそれに固定してセルのトップを閉鎖することができる。このカバー(49)は窓(50)を含むが、これはコンパートメント(46)の真上に置かれ、それにより放射線がカバーを通してセル(46)中に通過することを可能にする。

【0091】

セルの使用に際して、ハウジング(41)はブラットホームの表面の反対に置かれるが、このブラットホームはその上に形成された捕獲要素を有し、蓋(49)がその表面から離れるようにする。これにより、コンパートメント(46)はブラットホームの検知区域と通信するようになる。それから、検査すべき試料をフローライン(45)を通じてコンパートメント(46)中に加えて、ブラットホームの表面上の捕獲要素と接触させるようにする。それから、種々の捕獲点で誘導された蛍光の測定を前述のように実施する。

【0092】

図8はブラットホームの可能な代わりの形を図示している。

検知エレメントは種々の方式、例えば、長方形、円形、六角形—中心形、楕円形、線形もしくは迷路形に配置することができる。検知区域は長方形、円形もしくは他のいかなる形状でもよい。溝は、等距離の線形もしくは等距離の円形のどちらで配置してもよく、またはそのような構造のセグメントに対応してもよい。

【0093】

ブラットホームは長方形もしくは円盤形のどちらかまたは他のいかなる形状でもあり得る。ブラットホームは一重もしくは多重の検知区域を備え得て、それぞれの検知区域は一重もしくは多重の捕獲要素を備え得て、そしてそれぞれの捕獲要素は一重もしくは多重の標識もしくは非標識の捕獲分子を備え得る。

【0094】

ブラットホームはまた、個別のマイクロタイターウェル中に一重もしくは多重のアッセイを実施するために、マイクロタイタータイプのプレート／装置に適合させることができる。これは、各々のマイクロタイタープレートの寸法に無関係に、全てのプレートタイプ：96, 384, 1536もしくはそれ以上の数のウェルに対して達成できる。

【0095】

以下はブラットホームの特異的な例である。

1. 3-Dブラットホームの物理的性能：異常反射1 a. ブラットホーム1 遠伝子チップ変換器のブラットホームは厚さ0.7 mmの平面で透明な基板(SchotttによるガラスAF45)を備えている。この基板の中に、周期的な表面構造を写真平板手法(フォトレジストの固着、 $<1\ \mu\text{m}$ ；二重ビーム干渉分光法／ホログラフィーのどちらかによるレジスト中への周期的構造の書き入れ；Arガスをを用いる反応性イオンエッチングでのレジストのエッチング；残存するフォトレジストの剥ぎ取り)によってエッチングする。

【0096】

表面構造の形は正弦曲線に近い。単一構造の幅(周期)は360 nmである。溝の深さはおよそ38 nmである。

均一に構造化したガラス表面のトップに、波長633 nmでおよそ2.2の高い屈折率を持つ誘電性の透明な金属酸化物の膜(Ta_2O_5)を固着させる。このプロセスはイオンプレーティングによる。この層の厚さは130 nmである。ガラス表面の第一次構造／構築は、高エネルギーで異方性の固着プロセスにより金属酸化物層のトップに転写される。

【0097】

高度に平行し、拡張されたコヒーレントレーザービームを、いわゆる共鳴位置に相当する、特殊角度 θ で変換器上に当てるときには、殆んど全ての光は変換器のブラットホームにより反射され、そして0。オーダーの透過強度は1%以下(任意の角度での90-95%に比較して)に減少する。

【0098】

殆んど全ての光が反射される共鳴条件の幅 $\Delta\theta$ は、波長 λ (633 nm、固定)および放射線損失係数 α に比例する。放射線損失係数は回折格子溝の深さ、波形構造の形状および負荷サイクルにより支配され、そして溝の深さが増加すると殆んど二次方程式的に増加する。我々の場合(レーザー波長633 nm、金属酸化物層130 nm、溝の深さ38 nm)については、放射線損失はおよそ2000/cmである、

即ち、そのような層システムにおける誘導レーザービームの伝播距離は、それが周期的構造によりブラットホームから回折される前では、 $1/2000\text{ cm}=5\text{ }\mu\text{m}$ である。これは驚くほど短い距離である。それ故に、これらの条件下では導波はなにも起こらない。ブラットホームの規格の精密化により、この伝播距離をさらに減少させることができる。

【0099】

共鳴効果の特性化のために、平行ビーム(TE偏光)の強度を4mmの直径区域に対して $100\text{ }\mu\text{W}$ に調節する(パワーメーターNewport NRC 1835)。ブラットホームの正常および入射ビームの間の角度を異常反射(共鳴条件)の中心位置から1から2度回転させる。中心位置は 2.5° にある。それから、ブラットホームを $5/1000^\circ$ 刻みで回転させて(Newport NRCコントローラーPM 500)、透過ビームのパワーの変化を追跡する。共鳴角においては、元来の透過ビームの1%以下($<1\text{ }\mu\text{W}$)が検出器に到達する。入射レーザービームのパワーは全て反射される(正反射性の反射ビーム：おおよそ100%)。

【0100】

異常反射に対する共鳴の最大の半値幅(FWHM)は我々の場合 0.9° である。全部の変換器の表面($18\text{ mm}\times 18\text{ mm}$)上での反射の均一性は90%より良い。

【0101】

1b. ブラットホーム2 表面構造の形は長方形に近い。単一構造の幅(周期)は 360 nm である。溝の深さはおおよそ 52 nm である。均一に構造化したガラス表面のトップに、波長 633 nm でおおよそ2.15の高い屈折率を持つ誘電性の透明な金属酸化物の膜(Ta_2O_5)を固着させる。このプロセスはスパッタリングによる。この層の厚さは 150 nm である。ガラス表面の第一次構造/構築は、高エネルギーで異方性の固着プロセスにより金属酸化物層のトップに転写される。

【0102】

高度に平行し、拡張されたコヒーレントレーザー光を、共鳴位置に相当する特殊角度 θ で変換器上に当てるときには、殆んど全ての光は変換器のブラットホームにより反射され、そして0.オーダーの透過強度は1%以下(任意の角度での90-95%に比較して)に減少する。

【0103】

殆んど全ての光が反射される共鳴条件の幅 $\Delta\theta$ は放射線損失係数 α に比例する。我々の場合(レーザー波長 633 nm 、金属酸化物層 150 nm 、溝の深さ 52 nm)における放射線損失係数は $2000/\text{cm}$ より上である、即ち、そのような層システム中に発射された誘導レーザービームの伝播距離は、それが周期的構造によりブラットホームから回折される前では、 $1/2000\text{ cm}=5\text{ }\mu\text{m}$ である。それ故

に、これらの条件下では導波はなにも起こらない。

【0104】

共鳴効果の特性化のために、平行ビーム(T E 偏光)の強度を4 mmの直径区域に対して600 μ Wに調節する(パワーメーターNewport NRC 1835)。ブラットホームの正常および入射ビームの間の角度を正常入射から4度回転させる。それから、ブラットホームを5 / 1000° 刻みで回転させて(Newport NRCコントローラーPM 500)、透過ビームのパワーの変化を追跡する。共鳴角においては、元来の透過ビームの0.5%以下(<3 μ W)が検出器に到達する。入射レーザービームのパワーは全て反射される(正反射性の反射ビーム：おおそ100%)。

【0105】

ブラットホーム1に比べてより深い溝に従ってブラットホーム2の共鳴幅が広がることにより、+1および-1の回折オーダーの共鳴カーブが重複して、正確に正常入射に位置する単一の、極度に広い共鳴を創成する。異常反射に対する共鳴の最大の全半値幅(FWHM)は我々の場合4.2°である。全部の変換器の表面(18 mm×18 mm)上での反射の均一性は95%より良い。

【0106】

2. 遺伝子発現分析の実施例a) 作成 図2を基準として記載されるタイプのセンサーブラットホーム(寸法18×18 mm²)を先ずクロロフォルム(FLUKA, "puriss")中で二回、引き続いてイソプロパノール(Merck, "Uvasol")中で二回、それぞれ15分間、超音波洗浄をした。それから、ブラットホームを真空中で乾燥し、UVクリーナー中で30分間、清浄にした(Boeckel Industries Inc, model 135500)。オルトキシレンを75℃に加熱し(攪拌)、そして2% v/vの3-グリシドイルプロピルトリメトキシシラン(FLUKA, "purum")ならびに0.2% v/vのN-エチルジイソプロピルアミン(FLUKA, "purum")を加熱した溶媒中に加えた(攪拌)。ブラットホームをラック中に取り付けてから75℃の溶液中で7時間インキュベートした(攪拌)。引き続いて、ブラットホームを新鮮なアセトニトリル(FLUKA, "HPLC grade")中で三回、それぞれ15分間、超音波洗浄をした。それから、ブラットホームを2% v/vの3-アミノ-1-プロパノール(FLUKA, "purum")のアセトニトリル溶液中で15分間、超音波洗浄をしてから同一の溶媒中で一夜室温でインキュベートした(攪拌)。翌日、ブラットホームを先ず新鮮なイソプロパノール(FLUKA, "HPLC grade")中で三回15分間、それから新鮮なメタノール(Merck, "Uvasol")中で三回15分間、超音波洗浄をした。最後に、ブラットホームを乾燥し、真空中で保存した。

【0107】

b) 認識要素の固定化 10個の異なるcDNA(それぞれのcDNAは10回の繰返し実験：CYP 45

01A1、CYP4502B1EST、CYP4502B1、CYP4502B2、CYP4503A1ヒト、CYP4503A2、CYP4504A1、 β -アクトニン、GAPDH、外部標準)からなるアレーをインクジェットプリンター(Microdrop GmbH, Norderstedt, Germany)でブラットホーム上に印刷した。cDNA溶液の濃度は $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ であった。直径(10 インクジェット液滴/位置)は約 $250\text{ }\mu\text{m}$ であって、スポットのピッチは約 $500\text{ }\mu\text{m}$ であった。それ故に、 10×10 アレーの全寸法は $5\times 5\text{ mm}^2$ であった。固定化したcDNAスポットのレイアウトおよび帰属を図5に図式的に示している。この寸法($18\times 18\text{ mm}^2$)でブラットホームの中心にアレーを印刷した。引き続いて、ブラットホームを飽和水蒸気雰囲気中で密閉容器中で一夜インキュベートした。翌日、インキュベートしたチップは規定時間の間、例えば 80°C で1分間、焼付けし得る。それから、ブラットホームを脱イオン水で洗い流して、窒素気流で乾燥した。

【0108】

c) 検出のセットアップ 用いた検出のセットアップを図6に図式的に示している。励起レーザー(61)(HeNeレーザー、 633 nm 、 1.3 mW)および $20\times$ ビームエキスパンダー(64)を角度計(63)上に一緒に取り付けた(62)。ダイクロイックミラー(68)を使って、拡張したレーザービームをブラットホーム(67)に向けて当てた。レーザービームに対する回転中心はブラットホーム(67)の金属酸化物層の平面に置かれる。ブラットホームの表面から発光した蛍光をダイクロイックミラー(68)を経由して集めた。もう一つの蛍光フィルター(65)を用いて蛍光(69)を励起光から分離した。Nikon Noctレンズ(絞り数値 1.2)を装備し冷却したCCD(Astrocam EEV 30/11)カメラ(66)を用いて表面ブラットホームからの蛍光画像を測定した。角度計を使うと、ブラットホームの正規表面を基準として、入射する拡張したレーザービームの角度の調整が可能になる。エバネッセント共鳴条件下(即ち、入射する拡張したレーザービームを、ブラットホームを通して透過した光が最小値を示す角度に調整した)において蛍光画像を撮影した。

【0109】

d) チップカートリッジ ブラットホームを特別にデザインしたカートリッジ(41)に取り付けたが、これはPMMAポリマーから作られ図4に図式的に示している。くぼみ(44)はこの寸法($18\times 18\times 0.7\text{ mm}^2$)を持ち、インキュベーションチャンバー(46)は 0.2 mm の深さであった。インキュベーションチャンバー中の溶液は、PMMA中に穴をあけた直径 0.5 mm のフローチャネル(45)を経由して交換した。カートリッジの内容物は入口/出口(42)を経由して交換した。ブラットホームは、検知区域をインキュベーションチャンバーに向けて、カートリッジ中の対応するくぼみに置いた。カバー(49)を固定

してブラットホームをシーリングに押し付けた。カバーに機械工作／超精密機械加工した窓(50)は、励起光によるイルミネーションおよびブラットホーム表面の蛍光画像の捕捉を可能にした。カートリッジのバルブからバルブまでの容積は約14 μ Lであった。

【0110】

e) 変性ユニット 熱電気エレメントを使用して、フローカートリッジ中でブラットホームの変性(79℃)、インキュベーション(42℃)、再生(79℃)および洗浄(42℃)のための温度を制御した。

【0111】

f) 試料の作成 二つのグループのラット(それぞれラット3匹)を本研究に使用した。一つのグループ(処理群)は、体重1kgあたり80mgのフェノバルビタールナトリウム塩の生理食塩水(0.9%w/v NaCl)溶液で処理し、そして第二のグループ(コントロール群)は0.9%NaClだけで処理した。一日一回の処理を連続4日間行った。4日目の最後に、動物を屠殺し、そして肝臓の試料を液体窒素中で瞬間冷凍し、-80℃で保存した。

【0112】

引き続き、全RNA/mRNAを単離して逆転写により第一鎖cDNA中に標識し(コントロール群および処理群について、同一もしくは異なる発蛍光団の標識を持つ標識したデオキシヌクレオチドの組み込み)、精製し、そしてハイブリダイゼーション緩衝液20 μ L中に溶解した。

【0113】

g) アッセイ処理 Cavoステッパー注射器を使用してカートリッジ中に緩衝液および溶液を注入／吸引した。以下の工程を実施してラット中におけるCYP450の誘導を測定した：1) 79℃で30分間、ハイブリダイゼーション緩衝液(HB)1mLで前洗浄、HBと接触したブラットホームのバックグラウンド1の測定。

2) カートリッジ中への「コントロール」試料の注入、79℃で30分間変性、それから42℃で一夜インキュベーション。

3) 42℃で10分間、1mLのHBで後洗浄、HBと接触したブラットホームの「コントロール」強度の測定。

4) 再生：79℃で30分間、ハイブリダイゼーション緩衝液(HB)1mLで洗浄、HBと接触したブラットホームのバックグラウンド2の測定。

5) カートリッジ中への「処理」試料の注入、79℃で30分間変性、それから42℃で一夜インキュ

ベーション。

6) 42℃で10分間、1 mLのHBで後洗浄、HBと接触したプラットホームの「処理」強度の測定。

全ての蛍光画像はエバネッセント共鳴条件下で測定した。

【0114】

h) データ処理 全てのスポットの正味強度(コントロールバックグラウンド1および処理バックグラウンド2)を計算し、そして処理データセットの全ての強度を外部標準の強度の助けで正規化した。個々の遺伝子間の発現比率(倍率変化)を次の割り算により計算した: 倍率変化=正規化した処理/コントロール 10回の繰返し実験の平均値を計算した。

【0115】

i) 結果 エバネッセント共鳴条件下で測定したER-チップは、一般的に、約100倍強い強度および改善したシグナル/バックグラウンド比を示した。

次の表に倍率変化の平均値を要約する。

【表1】

遺伝子	倍率変化
CYP 450 1A1(ラット)	1.6
CYP 450 2B1 EST(ラット)	1.6
CYP 450 2B1(ラット)	2.5
CYP 450 2B2(ラット)	3.2
CYP 450 3A1(ヒト)	3.2
CYP 450 3A2(ラット)	2.5
CYP 450 4A1(ラット)	1.6
β -アクトチン(ラット)	2.1
GAPDH(ラット)	2.3

【0116】

3. 増強した増幅を例示する実施例 丁度上述した実施例に従って、プラットホームを作成し、処置した。試料のインキュベーションに続いて、2枚の画像を図6を基準として上述したCDDカメラの検出セットアップをもって撮影した。最初の画像はエバネッセント共鳴の条件に調整することなくエビ蛍光モードで撮影した(図7a、「エビ蛍光」)。第二の画像はエバネッセント共鳴条件下に撮影した(図

2b、(「ER増強」)、即ち、入射レーザービームの角度を、チップを通る透過光が最小値を示すまで、正常表面を基準として調整した。画像のプロフィール(正味のシグナル)は、ER増強で測定した強度が従来のエビ蛍光で得た強度より約100倍強いことを示している。

【0117】

上述した実施例では、単一の試料セル(41)を使用して試料をプラットフォームの検知区域と接触させる。複数の検知区域を有するプラットフォームとの補償にマイクロタイタータイプの試料容器を使用することにより、複数の試料の測定が可能になり測定効率を改善できることは高く評価されるであろう。

【0118】

4. 単一ヌクレオチドの多形性を識別するためのオリゴヌクレオチドのマイクロチップ(SNP) a. チップの作成 図2を基準として記載されるタイプのセンサープラットフォーム(寸法 $18 \times 18 \text{ mm}^2$)を先ずクロロフォルム(FLUKA, "purum")中で二回、引き続いてイソプロパノール(Merck, "Uvasol")中で二回、それぞれ15分間、超音波洗浄をした。それから、プラットフォームを真空中で乾燥し、UVクリーナー中で30分間、清浄にした(Boeckel Industries Inc, model 135500)。オルトキシレンを 75°C に加熱し(攪拌)、そして2% v/vの3-グリシジルプロピルトリメトキシシラン(FLUKA, "purum")ならびに0.2% v/vのN-エチルジイソプロピルアミン(FLUKA, "purum")を加熱した溶媒中に加えた(攪拌)。それから、プラットフォームをラック中に取り付けてから 75°C の溶液中で7時間インキュベートした(攪拌)。引き続いて、プラットフォームを新鮮なアセトニトリル(FLUKA, "HPLC grade")中で三回、それぞれ15分間、洗浄をした。最後に、プラットフォームを乾燥し、真空中で保存した。

【0119】

b. 捕獲要素の固定化 二つの異なるアミノ-修飾オリゴヌクレオチド(捕獲プローブ)をシラン化プラットフォーム上に基盤縞様レイアウト($5 \times 5 = 25$ スポット)で印刷した。GMP 417リングピンアレーヤーを印刷に用いた(Genetic Microsystems, Boston, MA)。捕獲分子として使用したオリゴヌクレオチドの濃度は 100 nmol/ml であった。スポットの直径は $125 \text{ }\mu\text{m}$ で中心から中心の距離は $500 \text{ }\mu\text{m}$ であった。二つのオリゴヌクレオチドはcPM(「捕獲完全マッチ」)およびcMM(「捕獲ミスマッチ」)と呼ばれ、一つの塩基においてのみ異なっている: cPM: $3' \text{CACAA TTCCACA } 5' \text{--NH}_2$ cMM: $3' \text{CACAACTCCACA } 5' \text{--NH}_2$ cPMおよびcMMは $5'$ 端にあるアミノ基で標識化されたが、これによりオリゴヌクレオチドがエポキシ機能化プラットフォームに共有結合することができる。この寸法($18 \times 18 \text{ mm}^2$)でプラットフォームの中心にアレーを印

刷した。引き続き、ブラットホームを飽和水蒸気雰囲気で密閉容器中で一夜インキュベートした。翌日、チップを乾燥し、50%尿素水溶液で洗浄した。それに代えて、ウシ血清アルブミン水溶液(BSA、1mg/ml)を用いた。ブロッキング後、チップを脱イオン水で洗い流して、窒素気流で乾燥した。

【0120】

c. 検出のセットアップ 先の実施例で記述したCCDセットアップを使用した。

【0121】

d. チップカートリッジ 先の実施例で記述したカートリッジを使用した。

【0122】

e. アナライト/試料 固定化した捕獲オリゴヌクレオチドのcPMおよびcMMに相補的な配列を有し、PM(「完全マッチ」)およびMM(「ミスマッチ」)と呼ばれる二つのCy5-標識オリゴヌクレオチドをアナライトとして使用した：PM：Cy5-5'GTGTTAAGGTGT3' MM：Cy5-5'GTGTTGAGGTGT3'アナライト溶液の濃度はそれぞれ30pMであった。

【0123】

f. アッセイ処理 ブラットホームを最初にハイブリダイゼーション緩衝液(HB)1mlで二回、洗浄の間を1分間遅らせて、洗浄した。引き続き、PMアナライト溶液(30pM)約15マイクロメートルをフローカートリッジ中へ注入した。30分間のインキュベーション後、ブラットホームを1mlのHBで洗浄し、そして蛍光画像(図9a、「PM」)をチップの共鳴位置で撮影した。引き続き、2×1mlの50%尿素水溶液を、注入の間を2分間遅らせて、注入することにより、結合した蛍光標識オリゴヌクレオチドを除去した(剥ぎ取った)。さらに2分後、2×1mlのHBを注入の間を2分間遅らせて、注入することによりチップを洗浄し、そして蛍光画像(図9b、「再生」)をチップの共鳴位置で撮影した。最後に、おおよそ15マイクロメートルのMMアナライト溶液(30pM)をフローカートリッジ中へ注入した。30分間のインキュベーション後、ブラットホームを1mlのHBで洗浄し、そして蛍光画像(図9c、「MM」)をチップの共鳴位置で撮影した。全ての工程は室温で実施した。

【0124】

g. データ処理 二つの異なるグループの捕獲スポット(cPMおよびcMM)の平均強度を両方の実験(30pMのPMアナライトおよび30pMのMMアナライト)について計算した。加えて、平均強度の差cPM-cMMおよび比率cPM/cMMを計算した。

【0125】

h. 結果 次の表に計算した全てのデータを要約する。一つの塩基(SNP)においてのみ異なる二つのC y 5ー標識オリゴヌクレオチドのアナライト、C y 5ー標識PMおよびC y 5ー標識MM、は得られたデータからはっきりと区別することができる。

【表2】

	30 pMのPMアナライトの平均 強度 [カウント]	30 pMのMMアナライトの平均 強度 [カウント]
c PMスポット	1140	704
c MMスポット	24	2075
c PMー c MM	1116	-1371
c PM / c MM	48	0.34

【0126】

5. 抗体免疫アッセイの実施例 一次抗体はセンサーブラットホームの表面上で空間的に解像されて固定化される(例えば、基盤縞パターン)。検出すべき抗原およびルミネセンスで標識した二次抗体の結合(検出すべき個別の抗原の二次エピトープの検出に用いる)は、先ず、異なる濃度で種々の抗原を含むアナライトと共に、それからルミネセンスで標識した二次抗体と共に引き続いたインキュベーションにより達成される。

【0127】

それに代えて、抗原(アナライト)およびルミネセンスで標識した二次抗体を前インキュベーション工程で混合し得るが、これでルミネセンスで標識した二次抗体の抗原との複合化が可能になる。この前インキュベーション工程の後で、センサーブラットホームの表面をこの混合物とインキュベートする。

【0128】

表面に結合したルミネセンスで標識した免疫複合体をERセットアップで定量化した。(適当な緩衝液、PBS、で先洗浄および、必要により、後洗浄)。

【0129】

6. 多重化免疫アッセイのためのタンパク質ーマイクロチップ a. チップの作成 上で記載されたタイプのセンサーブラットホーム(寸法 $18 \times 18 \text{ mm}^2$)をクロロフォルム(FLUKA, "purrris")中で二回、引き

続いてイソプロパノール(Merck, "Uvasol")中で二回、それぞれ15分間、超音波洗浄をした。それから、ブラットホームを真空中で乾燥し、UVクリーナー中で30分間、清浄にした(Boeckel Industries Inc, model 135500)。チップを小さい容器に入れてオクタデシルホスフェートの0.5 mMのブロパノール溶液中に24時間保存した。引き続いて、過剰のアルキルホスフェートを除去するために、チップをイソプロパノール5 mLで洗浄し、窒素気流中で乾燥した。この操作により、ブラットホームの表面上にアルキルホスフェートの自己-集合単層(SAM)を創成した。この接着促進層はブラットホームを疎水性(接触角は約100°)にして、疎水性の相互作用によりブラットホームへのタンパク質の吸着を可能にした。

【0130】

b. 捕獲要素の固定化 二つの異なるモノクローナル抗体、抗-ヒトコリオゴナドトリピン(抗-hCG)および抗-インターロイキン6(抗-IL6)、を飽和水蒸気雰囲気中で疎水性ブラットホーム上に碁盤模様レイアウト(4×4アレー、それぞれの抗体について8スポット)で印刷した。捕獲抗体溶液の濃度は、それぞれ、400および100マイクログラム/mLであった。インクジェットプリンターを印刷に用いた(Microdrop, Norderstedt, Germany)。スポットの直径は150マイクロメートルで中心から中心の距離は320マイクロメートルであった。印刷したアレーを密閉容器中で2時間の間、飽和水蒸気雰囲気中でインキュベートした。引き続いて、チップを乾燥し、10%のウシ血清アルブミン(BSA)、5%の蔗糖および0.02%のアジ化ナトリウムを含むリン酸塩で緩衝化した生理食塩水10 mLで洗い流した。この洗浄工程は、BSAの吸着によりチップの疎水性表面をブロックし、そして、捕獲要素が固定化されてしまった後では、表面をさらに親水性にした。その結果、このブロッキング操作は、増加したバックグラウンド蛍光をひき起こすかもしれない、タンパク質のブラットホームへの非特異的結合を防止した。ブロッキング後、チップを脱イオン水で洗い流して、窒素気流で乾燥した。ブラットホームは使用するまで冷蔵庫中に保存した。

【0131】

c. 検出のセットアップ 実施例2で記述したCCDセットアップを使用した。

【0132】

d. チップカートリッジ 実施例2で記述したカートリッジを使用した。

【0133】

e. アナライト/試料 三つのアナライト溶液を作成した: 1) 500 ng/mLのCy-5標識IL6を含む溶液、抗原 1) 50 ng/mLのCy-5標識ヒトコリオゴナドトリピン(hCG)を含む溶液、

抗原ⅠⅠⅠ) 50 ng/mlのⅠⅠⅠ6および100 ng/mlのC y-5で標識したポリクローナル抗

ⅠⅠⅠ6抗体を含む前インキュベートした混合物(1時間)。

1%のB S Aを含むP B S、p H 7.0をアナライト用の溶媒として用いた。

【0134】

f. アッセイ処理 プラットホームをカートリッジ中へ取り付け、1 mlの1% B S Aを含むP B S、p H 7.0で洗浄することにより、三つのプラットホーム(6 b. 項で記載のような)をアナライトのインキュベーション(e. 項参照)用に作成した。引き続いて、約15マイクロメートルのアナライト溶液、ⅠⅠⅠ)、ⅠⅠⅠ)およびⅠⅠⅠ)、をフローカートリッジ中へ注入した。インキュベーション時間はⅠ)およびⅠⅠ)に対してそれぞれ2時間であった。アナライトⅠⅠⅠ)に対しては、インキュベーション時間は12時間であった。アナライトのインキュベーションの後、プラットホームを1 mlの1% B S Aを含むP B S、p H 7.0で洗浄した。蛍光画像は、全チップからはオフー共鳴条件下(エビ蛍光、共鳴角から約7° 離して)で、それぞれのチップについては共鳴条件下(共鳴、入射光は正規を基準として約2.5°)で、撮影した。得られた画像およびデータを図1.Qに示す。

全ての工程は室温で実施した。

【0135】

g. データ処理 スポットの平均強度およびバックグラウンドをImage Arrayソフトウェア(Biodiscovery, Los Angeles, CA)の助けで計算した。図1.Qのスポット平均は、興味ある各々の捕獲要素についてバックグラウンドを補正した平均強度を表す。加えて、蛍光画像からのバックグラウンドの標準偏差としてノイズを計算した。それ故に、図1.Qのシグナル/ノイズはバックグラウンド標準偏差で割ったスポット平均の比に対応する。

【0136】

h. 結果 図1.Qに計算した全てのデータを要約する。エビ蛍光モードならびに共鳴条件下で得られた画像およびデータを図1.Qに要約する。横列のⅠ)およびⅠⅠ)は、固定化したモノクローナル捕獲抗体と標識抗原(それぞれ、C y-5で標識したⅠⅠⅠ6およびh C G)の間の免疫反応の結果を示す。横列のⅠⅠⅠ)は、固定化したモノクローナル抗体(抗ⅠⅠⅠ6)ならびにⅠⅠⅠ6抗原およびⅠⅠⅠ6に対するC y-5で標識した二次ポリクローナル抗体の前インキュベートした混合物の間におけるサンドイッチタイプの免疫反応に相当する。

【0137】

横列のⅠ)の結果については、シグナル強度はプラットホームのエビ蛍光モードにおける46カウントが

ら共鳴モードにおける1100カウントへ増加する。これは、スポット平均値に関して約24の増強係数に相当する。シグナル／ノイズ比は7.0(エビ蛍光)から69.2(共鳴)へ改善し、10の係数に相当する。

【0138】

横列の11)の結果については、シグナル強度はブラットホームのエビ蛍光モードにおける32カウントから共鳴モードにおける646カウントへ増加する。これは、スポット平均値に関して約20の増強係数に相当する。シグナル／ノイズ比は5.0(エビ蛍光)から75.1(共鳴)へ改善し、15の係数に相当する。

【0139】

横列の111)の結果については、シグナル強度はブラットホームのエビ蛍光モードにおける25カウントから共鳴モードにおける296カウントへ増加する。これは、スポット平均値に関して約12の増強係数に相当する。シグナル／ノイズ比は3.8(エビ蛍光)から44.1(共鳴)へ改善し、12の係数に相当する。

【0140】

全ての3アッセイについてのスポット平均およびシグナル／ノイズ値は、非共鳴モード(エビ蛍光)におけるチップに比べると、共鳴モードにおける同一のチップについては、少なくとも一桁のオーダーで高い。横列の1)および11)の蛍光画像は相補的である(碁盤縞レイアウト)。用いた全てのチップは同一セットの捕獲要素、即ち、モノクローナル抗hCGおよびモノクローナル抗IL6を有している。

記述した実施態様について多くの選択肢が可能であることは高く評価されるであろう。

【0141】

本ブラットホームのもう一つの特徴は、それにより大量のセットのデータを平行して求めることを可能にすることである。また、それは数回使用し得る。固定化した親和性複合体は、結合能力を実質的に完全に保持しながら、有機溶媒および／もしくはカオトロピック試剤(塩溶液)を用いて高温で再生することができる。

【0142】

上述の説明においては、検知領域の全部の区域が照射される。また、末端の捕獲要素が順番に励起されるように、非拡張焦点ビームを持つレーザーを使用して、検知領域を走査することも可能である。この配置は、CCDカメラより安価な光検出器、例えば光増幅器、の使用を可能にし、もしくはアバランシェホトダイオードを使用することができる。また、この配置は、レーザーエネルギーがさらに閉じ込めら

れる事実により、感度をさらに増強するであろう。

【0143】

また、本発明に従ってプラットホームを顕微鏡のスライドとして使用するようにデザインして、それらを蛍光顕微鏡と共に使用できるようにすることも可能である。

プラットホームはまた、WO97/02357に記載されているような大規模なマイクロ液体システムと使用するようにデザインすることができる。

【0144】

上の説明において、プラットホームの使用は、蛍光を励起して検知する応用において記載されてきている。親和性反応がルミネセンスの変化により検出される配置において、プラットホームを使用し得ることは高く評価されるであろう。親和性反応が屈折率の変化により検出される配置において、プラットホームを使用し得ることもまた高く評価されるであろう。

【0145】

本発明に従うプラットホームは多くの応用に使用することができるが、その内の下記のものは非限定的リストである。

一遺伝子発現ーゲノム医学ー薬理ゲノム医学ー毒性ゲノム医学ー毒性プロテオミックスー遺伝学ー薬理遺伝学ー毒性遺伝学ーエクソン／イントロン発現プロファイリングーヒト白血球抗体(HLA)の判定ースライシング変異体の分析ープロテオミックス(チップ上のタンパク質アッセイ)ー患者のモニタリング(薬物、代謝物およびマーカー)ーポイントオブケア、「個人別医療」ー診断学ープロテオミックス用のチップ上の二次ゲルもしくは一般的な二次分離ーSNP(単一ヌクレオチド多形)、ミニシーケンシングー高スループットスクリーニングーコンビナトリアル化学ータンパク質ータンパク質相互作用ー分子相互作用ーチップを用いたタンパク質ー抗体およびペプチド相互作用ー緑色蛍光タンパク質(GFP)ーinsituハイブリダイゼーションー共焦点顕微鏡法ー蛍光相関分光法ー従来の顕微鏡法ーMALDI-TOFMS【図面の簡単な説明】

【図1】 光学的パラメーターを分析するための品質制御器具および本発明に従ったプラットホームのエバネッセント共鳴条件の概略図である。

【図2】 本発明に従ったセンサープラットホームの概略図である。

【図3】 プラットホームとの関連においてエバネッセント場プロフィールを示す概略図である。

【図4a】 チップカートリッジを示す概略図である。

【図4b】 チップカートリッジを示す概略図である。

【図5】 本発明の一つの実施例におけるアレーレイアウトを示す。

【図6】 本発明の一つの実施例に従って蛍光を測定するために用いるレイアウトを図式的に示す。

【図7】 先行技法および本発明によって得られた結果の比較を示す。

【図8】 プラットホームの別の形を図示する。

【図9a】 実施例5に記載の共鳴条件下で本プラットホームを用いて、30 pmのPMアナライトのインキュベーション、再生、そして30 pmのMMアナライトのインキュベーションの後に得られた蛍光画像を示す。

【図9b】 実施例5に記載の共鳴条件下で本プラットホームを用いて、30 pmのPMアナライトのインキュベーション、再生、そして30 pmのMMアナライトのインキュベーションの後に得られた蛍光画像を示す。

【図9c】 実施例5に記載の共鳴条件下で本プラットホームを用いて、30 pmのPMアナライトのインキュベーション、再生、そして30 pmのMMアナライトのインキュベーションの後に得られた蛍光画像を示す。

【図10】 実施例6に記載のエピ蛍光および共鳴条件下で本プラットホームを用いて得られた蛍光画像およびデータを示す。

図面

【図1】

FIG. 1

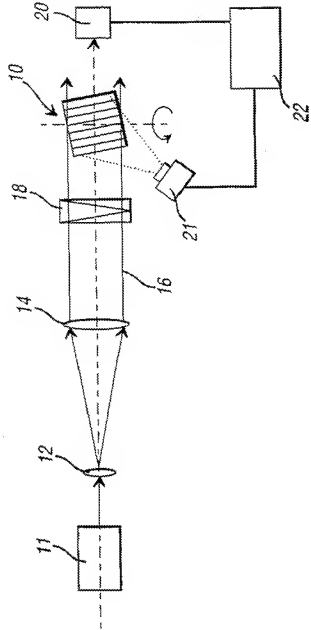


FIG.2

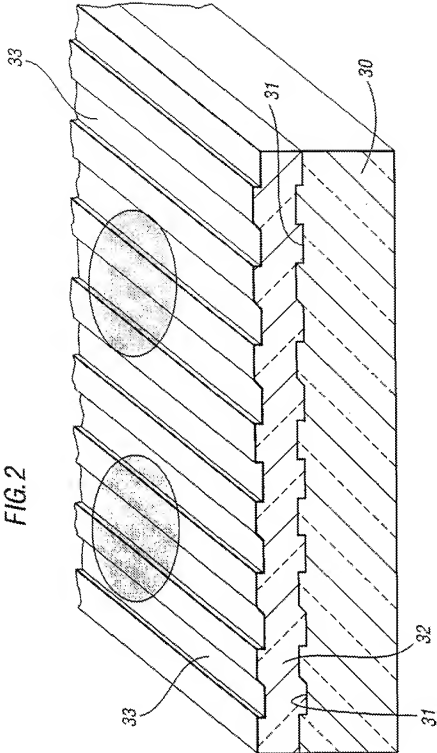
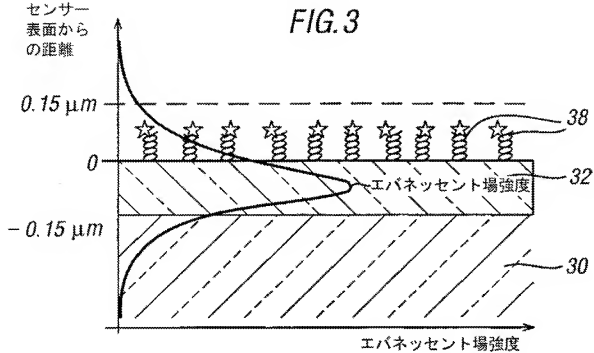
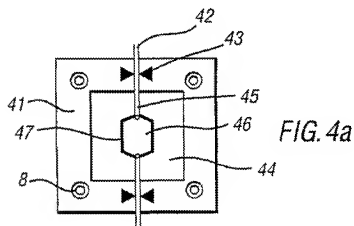


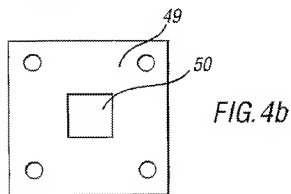
FIG. 3



【図4a】



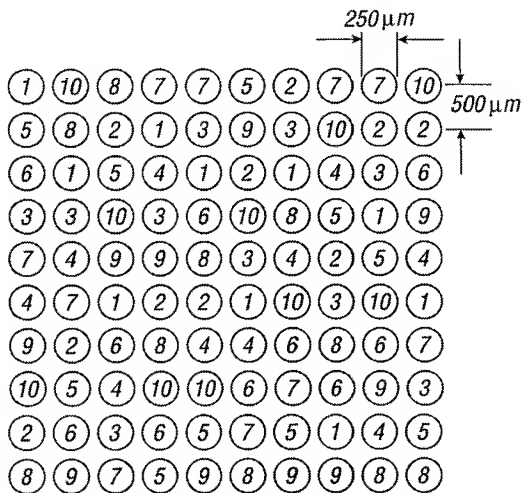
【図4b】



【図5】

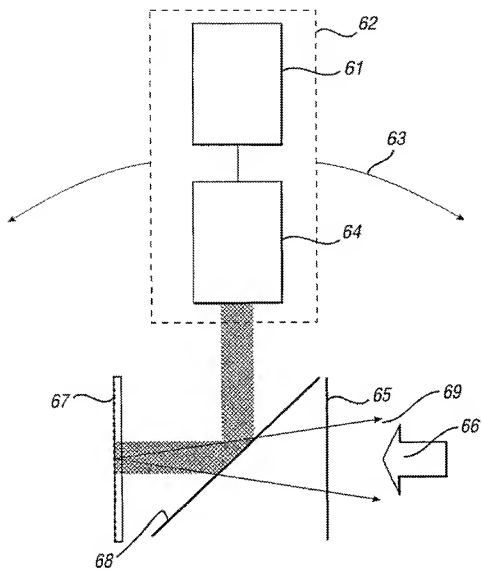
#	cDNA
1	1A1
2	2B1 EST
3	2B1
4	2B2
5	3A1 h.
6	3A2
7	4A1
8	β -アクチン
9	GAPDH
10	外部標準

FIG. 5



【図6】

FIG. 6



【図7】

FIG. 7a

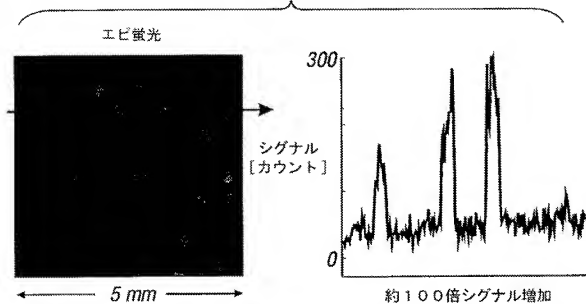
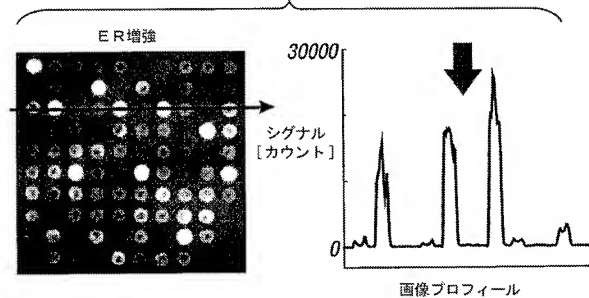


FIG. 7b



【図8】

FIG. 8a

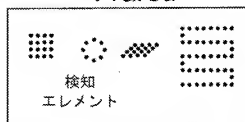


FIG. 8b

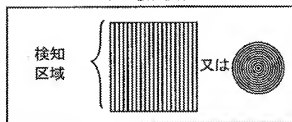


FIG. 8c

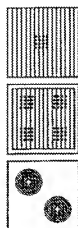


FIG. 8d

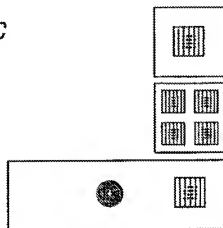


FIG. 8e

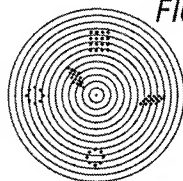
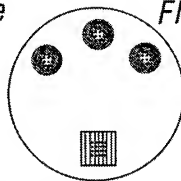
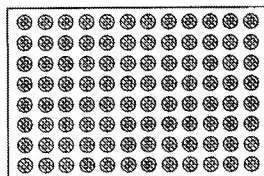


FIG. 8f



円盤形プラットフォーム

FIG. 8g



マイクロタイター／ナノタイタータイプ
装置 (96/384/...))

PM

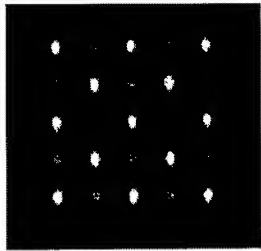


FIG. 9a

再生
50%尿素

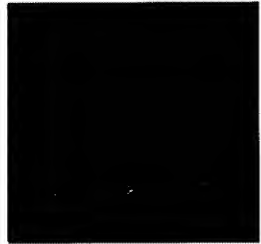


FIG. 9b

MM

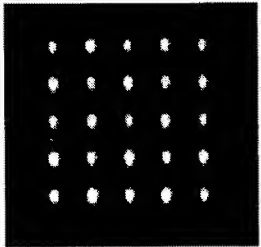


FIG. 9c

FIG.10

	エピソード光		共鳴	
	画像	スポット平均シグナル/ [カウント]	画像	スポット平均シグナル/ [カウント]
以下でインキュベート したプロテオチャップ				
I) Cy5標識IL6 (500 ng/ml, 10マイクロL, 2時間 インキュベーション)		46		1100
II) Cy5標識hCG (50 ng/ml, 10マイクロL, 2時間 インキュベーション)		32		646
III) 抗IL6 (モノクローナル)/ IL6の混合物で標識した Cy5 (50 ng/ml, 10マイクロL, 12時間 インキュベーション)		25		296

*) 画像バックグラウンドの標準偏差として規定されたノイズ [カウント]

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】一つもしくは複数の試料を分析するための方法であって、試料をセンサブラットホームの検知区域と接触させることを含むが、当該ブラットホームは屈折率(n_1)を有する光透過性の基板を備え、薄い、非金属性の光透過性層をその基板の一つの表面上に形成し、当該層は(n_1)より大きい屈折率(n_2)を有し、一重もしくは多重の捕獲要素に対してそれぞれ、一重もしくは多重の検知区域または領域を規定する周期性の溝を備えた一重もしくは多重の波形構造をその中に組み込みんでいる当該ブラットホームは、当該溝が、

a)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレント光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折できるが、それらは干渉して透過ビームの減少および入射光の異常に高い反射をもたらし、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するか；または

b)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレントな直線偏光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折できるが、それらは干渉して透過ビームの殆んど全部の消滅および入射光の異常に高い反射をもたらす、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生する、
のどちらかのように、形状化し、寸法化しかつ配向しているということを特徴とし、

さらに、エバネッセント共鳴をブラットホームの検知区域内で起こさせるように光ビームでそのブラットホームを照射することおよびその検知区域から発散する放射線を検出することを含む、方法。

【請求項 2】当該波形構造は、モノもしくは多回折性であるところの実質的に平行な周期性の溝を備え、溝は一重もしくは多重の検知区域または領域を表わす、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】請求項 1 もしくは請求項 2 記載の方法であって、

(a)この溝の深さは 3 nm から光透過性の層の厚さまでの範囲にあり、

(b)この光透過性の層の厚さは 30 から 1000 nm までの範囲にあり、

(c)この波形構造の周期は 200 から 1000 nm までの範囲にあり、

(d)この光透過性の層の厚さに対する溝の深さの比率は 0.02 から 1 までの範囲にあり、そして

(e)溝の周期に対する溝の幅の比率は 0.2 から 0.8 までの範囲にある、方法。

【請求項 4】ブラットホームの基板を無機物質から形成する、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】その基板を有機物質から形成する、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】その基板をガラス、 SiO_2 、水晶もしくは Si から形成する、請求項 4 記載の方法。

【請求項 7】その基板を PP、PC、PMMA、PI、PS、PE、PET もしくは PU のような有機ポリマーから形成する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】光透過性の層を無機物質から形成する、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】光透過性の層を有機物質から形成する、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】光透過性の層が Ta_2O_5 、 TiO_2 、 Nb_2O_5 、 ZrO_2 、 ZnO もしくは HfO_2 のような金属酸化物である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】光透過性の層をポリアミド、ポリイミド、PP、PS、PMMA、ポリアクリル酸、ポリアクリルエーテル、ポリチオエーテルもしくはポリ(フェニレンスルフィド)およびそれらの誘導体から形成する、請求項 9 記載の方法。

【請求項 12】回折溝の深さが 3 nm から光透過性の層の厚さまで、好ましくは 10 nm から光透過性の層の厚さまでの範囲にある、請求項 1 もしくは請求項 1 に従属するときは請求項 4～11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】光透過性の層の厚さは 30 から 1000 nm までの範囲にあり、回折溝の周期は 200 から 1000 nm までの範囲にあり、この光透過性の層の厚さに対するこの溝の深さの比率は 0.02 から 1 までの範囲にあり、そして溝の周期に対する溝の幅の比率は 0.2 から 0.8 までの範囲にあって、極めて短い伝播距離をもたらす、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】この溝が一般的に断面において長方形である、前の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】この溝が一般的に断面において正弦曲線状、台形波状、鋸歯断面状である、請求項 1～13 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 16】ブラットホームは正方形もしくは長方形であり、そして溝はブラットホームに沿って直線的に伸展する、前の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】ブラットホームは円盤状であり、そして溝は円形もしくは線形である、請求項 1～15 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 18】溝を基板の表面上に形成する、前の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 9】 溝を光透過性の層の表面上に形成する、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 0】 溝を基板の表面上および光透過性の層の表面上の両方に形成する、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 1】 一つもしくはそれ以上の検知区域の波形表面を、ある特定の励起波長および／もしくは特定のタイプの偏光に対し最適化する、前の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 2】 一つもしくはそれ以上の検知区域の波形表面を、異なる波長および／もしくは偏光の配向に対し最適化する、請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 3】 光透過性の層の表面が一つもしくは複数の検知区域を含み、それもしくはそれらのおおのが一つもしくは複数の捕獲要素を担う、前の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 4】 おおのの捕獲要素は、親和性反応ができるところの個別のおよび／もしくは混合の捕獲分子を含む、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】 捕獲要素を二次元アレーで配列する、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 6】 ブラットホームが、捕獲分子の固定化を可能にするために、光透過性の層の表面に固着した接着促進層を含む、請求項 2 3 から請求項 2 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 7】 接着促進層は無機および／もしくは有機分子またはそれらの誘導体の一重および多重の層を含み、それらは、得られた接着促進層システムの全体的な機能的性質を操作するために、付加的な化学的、物理的、分光的および／もしくは光物理的、光化学的／生物学的／生化学的性質を付与する、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 8】 ブラットホームを複数の検知区域もしくは領域とともに形成し、おおのは試料の多色の励起および検出に適するそれ自身の回折溝もしくは多重の積層溝を有する、前の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 9】 ブラットホーム上に固定化すべき捕獲要素もしくは分子の数は限定されことなく、遺伝子、DNA 配列、DNA モチーフ、DNA マイクロサテライト、単一ヌクレオチド多型、興味ある種もしくは生体のゲノムに寄与するタンパク質もしくは細胞断片、またはそれらの選択もしくは組み合わせの数に対応する、請求項 1 ～ 2 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 0】 一つもしくは複数の捕獲要素または分子が次の一つもしくはそれ以上を含む、請求項 2 3 ～ 2 9 のいずれか 1 項記載の方法：

ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド(およびそれらの化学的誘導体)

DNA(二本鎖もしくは一本鎖) a)直線型(およびそれらの化学的誘導体)、b)環状型(例えば、プラスミ

ド、コスミド、BAC、YAC)

全RNA、メッセンジャーRNA、cRNA、ミトコンドリアRNA、人工RNA、アプタマーPNA
(ペプチド核酸)

ポリクローナル、モノクローナル、組み替え型の、改変した抗体、抗原、ハプテン、抗体FABサブユニット(必要により修飾した)

タンパク質、修飾したタンパク質、酵素、酵素コファクターもしくは阻害剤、タンパク質複合体、レクチン、ヒスチジン標識タンパク質、ヒスチジンタグ成分(His-tag)のためのキレーター、タグ付けタンパク質、人工抗体、分子インプリント、プラスチックポリマー膜受容体、全細胞、細胞断片および細胞性下部構造、シナプス、アゴニスト/アンタゴニスト、細胞、細胞内小器官、例えばミクロソーム
ベンゾジアゼピンのような小分子

プロスタグランジン

抗生物質、薬剤、代謝物、薬剤代謝物

天然物

炭水化物および誘導体

天然および人工リガンド

ステロイド、ホルモン

ペプチド

生来もしくは人工ポリマー

分子プローブ

天然および人工受容体

そしてそれらの化学的誘導体

キレート試薬、クラウンエーテル、リガンド、超分子集合体

指示薬(pH、電位、膜電位、酸化還元電位)

組織試料(組織マイクロアレイ)。

【請求項31】 検査下の試料に蛍光を誘起する物質を加え、そして増強したエバネッセント場による試料の励起によって、当該試料に誘導された蛍光を検知することを含む、前の請求項のいずれか記載の方法。

【請求項32】 蛍光を誘起する物質がルミネセンスのマーカーを含む、請求項31記載の方法。

【請求項33】 ルミネセンスのマーカーは、400nmから1200nmまでの範囲にルミネセンスを

有し、一つまたはそれ以上の親和性パートナーに付着するために官能基化もしくは修飾されている一つもしくは複数のルミネセンスの化合物を含み、以下の一つまたはそれ以上の誘導体を含む、請求項32記載の方法：

ポリフェニルおよびヘテロ芳香族化合物、

スチルベン、

クマリン、

キサントゲン染料、

メチン染料、

オキサジン染料、

ローダミン、

フルオレセイン、

クマリン、スチルベン

パイレン、ペリレン

シアニン、オキサシアニン、フタロシアニン、ボルフィリン、ナフタロシアニン、アゾベンゼン誘導体、ジスチリルビフェニル

遷移金属錯体、例えばポリピリジル／ルテニウム錯体、塩化トリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム、塩化トリス(1,10-フェナンスロリン)ルテニウム、塩化トリス(4,7-ジフェニル-1,10-フェナンスロリン)ルテニウムおよびポリピリジル／フェナジン／ルテニウムの錯体、オクタエチル-白金-ボルフィリン、ユーロピウムおよびテルビウム錯体

量子ドット粒子／ビーズもしくはそれらの誘導体。

【請求項34】以下のいずれか一つもしくはそれ以上において用いられるときの、前の請求項のいずれかに記載の方法：

ー遺伝子発現

ーゲノム医学

ー薬理ゲノム医学

ー毒性ゲノム医学

ー毒性プロテオミックス

ー遺伝学

ー薬理遺伝学

- ー毒性遺伝学
- ーエクソン／イントロン発現プロファイリング
- ーヒト白血球抗体(HLA)の判定
- ースプライシング変異体の分析
- ープロテオミックス(チップ上のタンパク質アッセイ)
- ー患者のモニタリング(薬物、代謝物およびマーカー)
- ーポイントオブケア、「個人別医療」
- ー診断学
- ープロテオミックス用のチップ上の二次ゲル
- ーSNP(単一ヌクレオチド多形)、ミニシーケンシング
- ー高スループットスクリーニング
- ーコンピナトリアル化学
- ータンパク質ータンパク質相互作用
- ー分子相互作用
- ーチップを用いたタンパク質ー抗体およびペプチド相互作用
- ー緑色蛍光タンパク質(GFP)
- ーin-situハイブリダイゼーション
- ー共焦点顕微鏡法
- ー蛍光相関分光法
- ー従来の顕微鏡法
- ーMALDIーTOFMS。

【請求項35】ブラットホームを備える、試料分析用の器具であって、当該ブラットホームは屈折率(n_1)を有する光透過性の基板を備え、薄い、非金属性の光透過性層をその基板の一つの表面上に形成し、当該層は(n_1)より大きい屈折率(n_2)を有し、一重もしくは多重の捕獲要素に対してそれぞれ、一重もしくは多重の検知区域または領域を規定する周期性の溝を備えた一重もしくは多重の波形構造をその中に組み込みんでいる当該ブラットホームは、当該溝が、

a)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレント光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折できるが、それらは干渉して透過ビームの減少および入射光の異常に高い反射をもたらし、それにより一重も

しくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するか；または

b) 当該プラットホーム上に入射するコヒーレントな直線偏光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折できるが、それらは干渉して透過ビームの殆んど全部の消滅および入射光の異常に高い反射をもたらす、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生する装置、光ビームを発生させて、それがエバネッセント共鳴をプラットホームで起こさせ、それによってプラットホームの検知区域中に増強した共鳴場を創成させるところの角度でプラットホーム上に入射させるように、ビームを指示する手段、ならびにプラットホームの検知区域上にもしくは近傍に固着する物質の特質を検出するための手段。

【請求項 3 6】 光発生の手段がコヒーレントレーザービームを放射するためのレーザーを含む、請求項 3 5 記載の器具。

【請求項 3 7】 光発生の手段が、放電ランプおよび Hg もしくは Xe ランプのような低圧ランプ、または光放射ダイオードを含む、請求項 3 5 記載の器具。

【請求項 3 8】 請求項 3 6 記載の器具であって、それが角度 θ でプラットホームに入射するようにレーザービームを指示するための光学エレメントを含み、その角度 θ は式 $\sin \theta = n - \lambda / \Lambda$ によって定義され、そこでは Λ は回折溝の周期であり、 λ は入射光の波長であり、そして n は光透過性の層の有効屈折率である、器具。

【請求項 3 9】 検出手段をアレンジして、蛍光、燐光、化学ルミネセンスおよび電子ルミネセンスのようなルミネセンスを検出する、請求項 3 5 ～ 3 8 のいずれか 1 項記載の器具。

【請求項 4 0】 検出手段をアレンジして、屈折率における付加的もしくは合同の変化を検出する、請求項 3 5 ～ 3 9 のいずれか 1 項記載の器具。

【請求項 4 1】 入射ビームを配置して、全てもしくはおのおのの検知区域を照射する、請求項 3 5 ～ 4 0 のいずれか 1 項記載の器具。

【請求項 4 2】 分析すべき検知区域の小さな副部位を照射するようにビームを配置し、そしてプラットホームの検知区域にわたって走査するために相対的移動を実行できるように、ビームおよびプラットホームを配置する、請求項 3 5 ～ 4 0 のいずれか 1 項記載の器具。

【請求項 4 3】 試料を検知区域と接触させるために、プラットホームの検知区域とは反対に位置させるカートリッジを含む、請求項 3 5 ～ 4 2 のいずれか 1 項記載の器具。

【請求項 4 4】 検査すべき複数の試料を含むためのマイクロタイタータイプの装置を含む、請求項 3 5 ～ 4 2 のいずれか 1 項記載の器具。

【請求項45】屈折率(n_1)を有する光透過性の基板、その基板の一つの表面上に形成した薄い、光透過性の層を備えているブラットホームであって、当該層は(n_1)より大きい屈折率(n_2)を有し、当該ブラットホームはその光透過性の層の中に、実質的に全体のブラットホームに覆って一重の波形構造もしくはブラットホーム上に配置した別の多重の波形構造を組み込んでいて、当該構造は実質的に平行な周期性の溝を備えているが、それらはモノもしくは多回折性であって、溝は一重もしくは多重の検知区域または領域を表わし、そこにおいては

- (a)この溝の深さは3 nmから光透過性の層の厚さまでの範囲にあり、
- (b)この光透過性の層の厚さは30から1000 nmまでの範囲にあり、
- (c)この波形構造の周期は200から1000 nmまでの範囲にあり、
- (d)この光透過性の層の厚さに対する溝の深さの比率は0.02から1までの範囲にあり、そして
- (e)溝の周期に対する溝の幅の比率は0.2から0.8までの範囲にある、ブラットホーム。

【請求項46】屈折率(n_1)を有する光透過性の基板、その基板の一つの表面上に形成した薄い、光透過性の層を備えている試料分析用のブラットホームであって、当該層は(n_1)より大きい屈折率(n_2)を有し、当該ブラットホームはその中に、それぞれの一重もしくは多重の捕獲要素に対して、一重もしくは多重の検知区域または領域を規定する周期性の溝を備えた一重もしくは多重の波形構造を組み込んでいて、当該溝は

- a)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレント光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折するが、それらは干渉して透過ビームの減少および入射光の異常に高い反射をもたらし、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するか；または
- b)当該ブラットホーム上に入射するコヒーレントな直線偏光を個別のビームもしくは回折オーダーに回折するが、それらは干渉して透過ビームの殆んど全部の消滅および入射光の異常に高い反射をもたらし、それにより一重もしくは多重の検知区域の表面で増強したエバネッセント場を発生するかのどちらかのように、形状化し、寸法化しかつ配向しており、

そこでは回折溝の深さは、3 nmから光透過性の層の厚さまで、好ましくは10 nmから光透過性の層の厚さまでの範囲にあり、この光透過性の層の厚さは30から1000 nmまでの範囲にあり、この波形構造の周期は200から1000 nmまでの範囲にあり、この光透過性の層の厚さに対するこの溝の深さの比率は0.02から1までの範囲にあり、そして溝の周期に対する溝の幅の比率は0.2から0.8までの範囲にあつて、極めて短い伝播距離をもたらす、ブラットホーム。

